

Aus dem Laboratorium für Virusforschung und der Inneren Abteilung
des Städtischen Wenckebach Krankenhauses, Berlin-Tempelhof

Ärztlicher Direktor: Professor Dr.W.D.Germer

Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes
in Poliomyelitis-infizierten Gewebekulturzellen
nach Unterbrechung der Virusreproduktion durch Guanidin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Renate Diefenthal
geb. Kochan
aus Berlin

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533915_0124

Aus dem Laboratorium für Virusforschung und der Inneren Abteilung
des Städtischen Wepckebach Krankenhauses, Berlin-Tempelhof

Ärztlicher Direktor: Professor Dr.W.D.Germer

Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes
in Poliomyelitis-infizierten Gewebekulturzellen
nach Unterbrechung der Virusreproduktion durch Guanidin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Renate Diefenthal
geb. Kochan
aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r
Referent: Priv.-Doz.Dr.med.Karl-Otto H a b e r m e h l
Korreferent: Professor Dr. med. Helmut C o p e r



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 20. Februar 1968

Einleitung und Fragestellung

Methodik

Virus
Nährlösung, Trypsin
Gewebekulturen
Bestimmung des Virustiters
Substanzen
Zytologische Technik

Ergebnisse

- I. Abhängigkeit der Poliovirusreproduktion von der Konzentration des Guanidins
- II. Das Verhalten der Zellteilung Poliomyelitis-infizierter Gewebekulturen unter der Einwirkung von Guanidin
 - 1) Hinweis auf das Vorliegen eines Colchizin-ähnlichen Effektes durch Untersuchung in 7stündigen Zeitintervallen
 - 2) Beweis für den Colchizin-ähnlichen Effekt durch Untersuchungen in kürzeren Zeitabständen
 - 3) Der Zeitpunkt des Auftretens des Colchizin-ähnlichen Effektes
- III. Mitoseanomalien nach Hemmung der Poliomyelitis-reproduktion durch Guanidin

Diskussion

Einfluß von Virusinfektionen auf die Zellteilung.
Die Hemmung der Virusreproduktion durch Guanidin.
Der Ablauf der Mitosen Poliomyelitis-infizierter Zellen unter Guanidin.,

Zusammenfassung

Literatur

E i n l e i t u n g

Im Verlaufe einer Virusinfektion gelangt das genetische Material des infizierenden Agens in das Innere der Zelle und bewirkt eine Umleitung der zellulären Stoffwechselprozesse. Je nach Art des Virus werden Zellreaktionen gehemmt und die Synthese neuer Virusnukleinsäuren und neuer Virusproteine veranlasst. Diese Vorgänge gehen mit morphologischen Veränderungen einher und können zum Tode der Zelle führen. Weiterhin hat sich gezeigt, daß neben den Prozessen, die für die Virussynthese notwendig sind, noch andere biochemische oder morphologische Reaktionen in Erscheinung treten können. Auch für das Zustandekommen dieser Veränderungen ist das infizierende Virus von Bedeutung.

Eine besondere Stellung nimmt das Verhalten der Zellteilung ein. Einige Viren bewirken eine Hemmung der Zellteilung, andere haben keinen Einfluß oder führen zu einer Steigerung der Zellteilung. Nach Infektion von Gewebekulturzellen mit Poliomyelitisvirus zeigt sich eine Steigerung der Zellteilungsrate, die das Ausmaß der Kontrollkulturen um mehr als 100 % übertrifft (HABERMEHL et al. (1964), (1966)). Hierfür ist der Ablauf der Virusinfektion während der ersten Stadien der Reproduktion erforderlich. Es braucht jedoch nicht mehr zur Polymerisation neuer Virus-Ribonukleinsäure zu kommen, da auch unter der Einwirkung von Guanidin, welches die virusspezifische Ribonukleinsäure-Polymerase hemmt, der mitosesteigernde Effekt unverändert nachweisbar ist (HABERMEHL (1966)).

Bisher durchgeführte Untersuchungen erstreckten sich auf den Zeitraum der ersten fünf Stunden nach Poliomyelitisinfektion, da durch den dann einsetzenden zytopathischen Effekt die weitere Beobachtung unterbrochen

wurde. Auch die vergleichend unter Guanidineinfluß vorgenommenen Untersuchungen erfassten den gleichen Zeitabschnitt (HABERMEHL (1966)).

Da es durch Guanidin möglich ist, den durch eine Polio-myelitisinfektion bedingten zytopathischen Effekt zu verhindern, ergab sich die Frage, wie sich die Zellteilung unter diesen Bedingungen während eines langen Beobachtungszeitraumes verhält.

Auf Grund der hier durchgeführten Versuche konnte bestätigt werden, daß in den ersten Stunden nach Infektionsbeginn eine Steigerung der Zellteilung stattfindet und daß bis zur 10. Stunde noch Mitosen vorkommen. Danach können keine Zellen mehr in die Mitose eintreten; die bereits in der Mitose befindlichen Zellen werden unter Ausbildung eines Colchizin-ähnlichen Effektes im Stadium der Metaphase arretiert.

Methodik

Virus

Für alle hier durchgeführten Experimente wurde ein Polio-myelitisvirus vom Typ I, Stamm Mahoney, verwendet. Zur Herstellung des Stammvirus wurden gut ausgewachsene, 1 - 2 Tage alte, in Rouxflaschen angezüchtete KB-Zellen verwendet. Nach Absaugen des Anzuchtmediums wurde ein Stammvirus der vorhergehenden Passage im Verhältnis 1 : 5 in Nährmedium (s. dort) verdünnt und als Inokulum benutzt. Nach einer Adsorptionszeit von 1 Stunde, unter mehrfachen Bewegungen der Flaschen zur besseren Verteilung des Virus, wurde das Inokulum entfernt, die Zellen einmal mit Nährmedium gewaschen und je Rouxflasche 60 ml Nährmedium mit Zusatz von 10 % inaktiviertem Kälberserum aufgegeben. 18 Stunden nach der Virusinokulation waren die Zellen durch die zytopathische Wirkung des Virus vollständig zerstört und hatten sich zum größten Teil von der Glaswand abgelöst. Die noch anhaftenden Zellen wurden mit Glasperlen abgelöst und das überstehende Medium zusammen mit den Zellen bei - 70° C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde diese Zellsuspension 5 Minuten lang heftig von Hand mit Glasperlen geschüttelt, um durch weitere Zerstörung der Zellen das darin befindliche Virus freizusetzen. Anschließend wurde 10 Minuten lang bei 3000 Upm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Die überstehende Flüssigkeit wurde als Stammvirus verwendet und bei - 70° C gelagert.

Nährlösungen, Trypsin

Für die Anzüchtung der Gewebekulturen und als Erhaltungsmedium während der Experimente wurde -wie bei den jeweiligen Experimenten angeführt - entweder eine Earle'sche Lösung unter Zugabe von Lactalbuminhydrolysat (NBCo) und Hefeextrakt (Yeastolate, Difco) in Endkonzentrationen von 0,5 bzw. 0,1 % verwendet oder das minimal essential Medium nach EAGLE (1959). Beide Nährlösungen enthielten 50 E/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 25 i.E./ml Mycostatin (Moronal). Die Sterilisation erfolgte vermittels Filtration durch Seitz-Filter EKS unter 1 Atü. Die Lösungen wurden bei + 4° C aufbewahrt.

Trypsin 1:300 (NBCo) wurde in einer Konzentration von 0,2 % in phosphatgepufferter Salzlösung (DULBECCO et al. (1954)) aufgelöst und ebenfalls durch Seitz-Filtration sterilisiert. Die Trypsinlösung wurde mit 0,5 % einer n/10 Versenlösung (Titriplex III, Merck) versetzt, weil hierdurch eine gleichmäßigere Suspension der Zellen bei der Passage zu erreichen ist.

Gewebekulturen

Für alle durchgeführten Experimente wurden KB-Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um einen permanenten Zellstamm, der aus einem menschlichen, epidermalen Karzinom des Mundbodens isoliert worden ist (EAGLE (1955)). Für die Zellpassage wurde jeweils von vollständig ausgewachsenen Kulturen in Rouxflaschen ausgegangen. Nach Absaugen des Anzuchtmediums wurden je Flasche 20 ml der Trypsin-Versen-Lösung bei 37° C aufgegeben. Nach etwa 6 Minuten konnten die Zellen durch leichtes Bewegen der Flaschen vom Glas abgelöst werden und wurden sofort in vorgekühlte Zentrifugengläser in Eiswasser gegeben, um eine weitere Einwirkung des Enzyms zu verhindern. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 500 Upm für 3 Minuten abgetrennt, die überstehende Trypsinlösung entfernt. Das Zellsediment wurde in frischem, vorgewärmtem Nährmedium resuspendiert, dessen Volumen so bemessen war, daß aus einer Rouxflasche 3 neue Rouxflaschen angesetzt werden konnten.

Für die Experimente und die Titerbestimmungen wurde die Zellsuspension in Plastik-Petrischalen von 6 cm Durchmesser der Firma Falcon Plastics, California, USA, einpipettiert. Für die Experimente, bei denen Mitosezählungen vorgenommen werden sollten, war in die Petrischalen je ein Deckglas 24 x 18 mm eingelegt; die Zellen konnten so gleichmäßig auf dem Deckglas auswachsen. Das Deckglas wurde zu den in den einzelnen Versuchen angegebenen Zeitpunkten entnommen und - wie unten beschrieben - fixiert und weiter bearbeitet. Nach Einpipettieren der Zellsuspension in die Petrischalen wurden diese in der Begasungsanlage unter 5 % CO₂ in Luft, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 37° C inkubiert (DIEFENTHAL et al. (1962)). Je nach der Dichte der Zeleinsaat waren diese Kulturen 24 oder 48 Stunden nach der Passage zu einem vollständigen Zellrasen ausgewachsen.

Bestimmung des Virustiters

Die Bestimmung des Gehaltes an infektiösen Viruspartikeln erfolgte mittels der Plaque-Technik auf Einschicht-Gewebekulturen von KB-Zellen in Plastik-Petrischalen. Hierfür wurden gut ausgewachsene Kulturen am 2. Tag nach der Passage verwendet. Die zu untersuchende Viruscharge wurde in Eagle-Medium ohne Zusatz von Kälberserum in Stufen von 1:10 verdünnt. Auf 2 Petrischalen wurden je 0,3 ml einer jeden Verdünnungsstufe vorsichtig aufgegeben, danach wurde dem darin enthaltenen Virus während einer Stunde durch Inkubation bei 37° C Gelegenheit zur Adsorption an die Zellen gegeben. Das Virusinokulum wurde dann abgesaugt und 5 ml eines Eagle-Mediums aufgegeben, das 5 % Kälberserum und 0,7 % Agar (Difco agar purified) enthielt. Anschließend wurden die Petrischalen, wie bereits während der Adsorptionszeit, in der Begasungsanlage

inkubiert. Nach 3 Tagen wurde eine Vitalfärbung der durch den zytopathischen Effekt des Virus noch nicht abgestorbenen Zellen durch Überschichtung mit einer 1:5000m-phosphatgepufferter Salzlösung hergestellten Neutralrotlösung durchgeführt. Etwa 2 - 3 Stunden nach der Überschichtung waren die lebenden Zellen gut anfärbt und somit die Plaques der abgestorbenen Zellen gut sichtbar. Die Anzahl der ausgezählten Plaques wurde auf plaquebildende Einheiten pro Milliliter (PFU/ml) berechnet.

Substanzen

a) N-Desacetyl-N-methylcolchizin (Colcemid, CIBA) lag in Ampullen zu 1 mg vor. Die Substanz wurde bis auf eine Endkonzentration von 0,025 µg/ml in Eagle-Medium oder Lactalbuminhydrolysat/Hefeextrakt-Earle (LY-Earle) verdünnt.

b) Guanidin hydrochlorid der Firma Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, USA. Diese Substanz wurde in nicht umkristallisiertem Zustand verwendet. Die Auflösung erfolgte zunächst im Mörser unter vorsichtiger Zugabe von Nährmedium, nach Erreichung der kompletten Lösung wurde mit Nährmedium auf die in den einzelnen Experimenten angegebenen Endkonzentrationen aufgefüllt.

Zytologische Technik

Die für zytologische Beobachtungen vorgesehenen Zellen wurden auf Deckgläsern gezüchtet, die in die Plastik-Petrischalen eingelegt waren. Zu den im einzelnen angegebenen Zeitpunkten wurden die Deckgläser entnommen. Es folgte 10maliges Eintauchen in phosphatgepufferter Lösung zur Entfernung von Nährmedium und Serumresten. Danach wurden die Zellen in Formol-Alkohol (1:5) für 10 Minuten fixiert, dann durch die absteigende Alkoholreihe bis zum Aqua dest. gegeben. Nach kurzem Eintauchen in kalte 1 n - HCl erfolgte die Hydrolyse in 1 n HCl bei 60 Grad C für genau 10 Minuten. Anschließend wurde die Feulgenfärbung durch Einbringen in Schiff'sches Reagenz für 2 Stunden durchgeführt. Nach 3maliger Spülung in SO₂-Wasser und Spülung für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser wurden die Präparate durch die aufsteigende Alkoholreihe gegeben und in Caedax eingedeckt. Für die zytologische Beurteilung und die Feststellung des Mitoseindex wurden je Präparat 3000 Zellen gezählt, die einzelnen Stadien des Mitosezyklus und die evtl. Mitoseanomalien differenziert.

Ergebnisse

I. Abhängigkeit der Poliovirusreproduktion von der Konzentration des Guanidins

Um die für die späteren Hemmversuche optimale Konzentration des Inhibitors zu ermitteln, wurde das Ausmaß der Virusreproduktion in Abhängigkeit von der Guanidinkonzentration gemessen.

Für die Untersuchungen wurden KB-Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen angezüchtet waren. Von einer Guanidin-Stammlösung in Nährmedium wurden durch Verdünnung Konzentrationen zwischen 100 und 800 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Das zur Anzüchtung verwendete Nährmedium wurde von den Petrischalen abgesaugt und durch jeweils 5 ml der entsprechenden Guanidinlösung in Nährmedium ohne Kälberserum ersetzt. Nach einer zweistündigen Vorbehandlung bei 37° C in der Inkubationsanlage bei 5 % CO_2 in Luft und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit wurde das Medium entfernt. Zur Inokulation wurden zu jeder Schale 2 ml Nährmedium mit der entsprechenden Guanidinkonzentration gegeben, die im Versuch der Abb. 1 insgesamt $8,2 \times 10^7$ PFU, im Versuch der Abb. 2 $1,02 \times 10^8$ PFU Poliomyelitisvirus enthielten. Bei einer gesamten Inokulationsdosis von $8,2 \times 10^7$ bzw. $1,02 \times 10^8$ PFU und einer mittleren Zellzahl von 2×10^6 Zellen pro Petrischale ergibt sich somit für den Versuch der Abb. 1 eine Infektionsmultiplizität von annähernd 41, für den der Abb. 2 eine solche von 51 PFU pro Zelle. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten wurde die Inokulationsflüssigkeit abgesaugt und jede Schale dreimal mit je 3 ml der entsprechenden Guanidinlösung gewaschen. Anschließend erhielten alle Schalen 5 ml Erhaltungsgemisch mit den entsprechenden Guanidinkonzentrationen unter Zusatz von 20 % Kälberserum. Durch diese Versuchsanordnung wurde erreicht, daß die Zellen während aller Manipulationen ständig unter der Einwirkung der entsprechenden Guanidinkonzentrationen gehalten wurden. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37 Grad C in der Begasungsanlage bis zur 21. Stunde nach Infektionsbeginn. Sodann wurden die noch am Zuchtungsgefäß anhaftenden Zellen mit Gummischabern abgekratzt und zusammen mit dem überstehenden Medium bei - 70 Grad C eingefroren. Zur Freisetzung restlichen zellgebundenen Virus wurde diese Suspension für 5 Minuten heftig mit Glasperlen von Hand geschüttelt und ohne vorherige Zentrifugation für die Virustitration

verwendet. Die so erhaltenen Werte wurden als "Gesamt-virusausbeute" bezeichnet (zellgebundenes + freigesetztes Virus) und in plaquebildenden Einheiten pro ml angegeben.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt. Auf der Ordinate ist das Ausmaß der Virusreproduktion in plaquebildenden Einheiten pro ml aufgetragen, auf der Abszisse die Konzentration des Guanidins. Es ist aus der Abb. 1 ersichtlich, daß bis zu einer Guanidinkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ eine deutliche Einschränkung der Virusreproduktion um mehrere Zehnerpotenzen erfolgt. - Der in der Abb. 2 angeführte Versuch wurde mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluß höherer Guanidinkonzentrationen zu erfassen. Die Untersuchung beginnt bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ und erfaßt somit nur noch den letzten Abschnitt des Kurvenverlaufes der Abb. 1. Berücksichtigt man weiterhin den veränderten Maßstab der Abszisse und Ordinate, so stimmen die beiden Ergebnisse überein. Aus dem Kurvenverlauf der Abb. 2 ist ersichtlich, daß eine Steigerung der Guanidinkonzentration nicht zu einer weiteren Abnahme der Poliomyelitisvirusreproduktion führt. Dies kann einerseits dadurch erklärt werden, daß ein geringer Prozentsatz des Virus nicht in die Eklipse eingetreten ist und deshalb von der Inokulation bis zum Ende des Experimentes den Zellen anhaftet. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß eine vollständige Hemmung der Virusreproduktion durch das Guanidin nicht erreicht werden kann.

Weiterhin wurden die zytopathischen Veränderungen der Zellen registriert. Ohne Guanidin ist es zu einem vollständigen zytopathischen Effekt gekommen: Die meisten Zellen haben sich von dem Boden des Kulturgefäßes abgelöst, die noch anhaftenden Zellen sind abgerundet, pyknotisch und stark granuliert. Durch Guanidin in Konzentrationen von mehr als 100 $\mu\text{g/ml}$ werden die zytopathischen Veränderungen weitgehend verhindert.

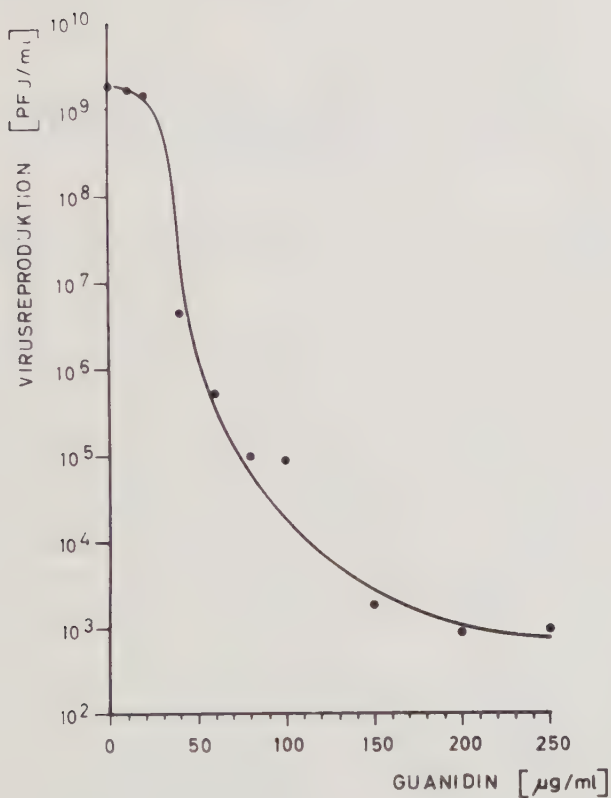


Abb. 1: Abhängigkeit der Poliovirusreproduktion von der Guanidinkonzentration. Hemmung der Virusreproduktion um $6 \log_{10}$ bei Guanidinkonzentrationen oberhalb von 200 $\mu\text{g/ml}$.

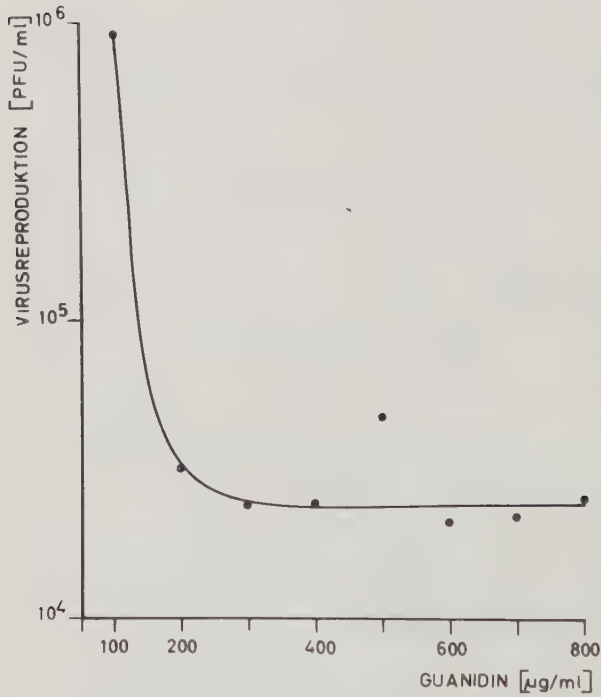


Abb. 2: Abhängigkeit der Poliovirusreproduktion von hohen Guanidinkonzentrationen. Oberhalb von 200 $\mu\text{g/ml}$ ist keine weitere Hemmung der Virusreproduktion zu beobachten.

Für die später durchzuführenden Versuche wurde auf Grund dieser Ergebnisse eine Inhibitorkonzentration von $250 \mu\text{g/ml}$ ausgewählt. Diese Konzentration liegt jenseits des exponentiellen Abfalles der Dosen-Wirkungs-Kurve.

II. Das Verhalten der Zellteilung Poliomyelitis- infizierter Gewebekulturen unter der Einwir- kung von Guanidin

1) Hinweis auf das Vorliegen eines Colchizin-ähnlichen Effektes durch Untersuchung in 7stündigen Zeitintervallen.

Um einen Überblick zu gewinnen über das Verhalten der Mitosen unter den Bedingungen einer durch Guanidin gehemmten Poliomyelitisreproduktion, wurde der Beobachtungszeitraum von 21 Stunden in 3 Abschnitte unterteilt. Die während eines Zeitraumes von jeweils 7 Stunden anfallenden Mitosen wurden durch Colchizin in der Metaphase arretiert. Neben der Registrierung der Zellteilung unter kombinierter Einwirkung von Poliomyelitisvirus und Guanidin wurden zur Kontrolle Kulturen nur unter Guanidin gehalten und weitere Kontrollen ohne jeglichen Zusatz. Auch in den Kontrollreihen wurden die Zellteilungen zusätzlich mit Colchizin blockiert. Hierdurch konnte geklärt werden, ob die zu späten Zeitpunkten unter Polio- und Guanidineinfluß noch nachweisbaren Mitosen auf einer tatsächlich stattgefundenen Zellteilung beruhen, oder ob es sich lediglich um blockierte Metaphasen handelt, die von einem früheren Zeitpunkt her liegen geblieben sind.

Es wurden KB-Zellen verwendet, die auf Deckgläsern in Plastik-Petrischalen angezüchtet waren. Das Guanidin wurde in einer Endkonzentration von $250 \mu\text{g/ml}$ angewendet, zur Colchizin-Arretierung Colcemid in einer Endkonzentration von $0,05 \mu\text{g/ml}$. Die Inokulation erfolgte mit Poliomyelitisvirus in einer Konzentration von $1,02 \times 10^8$ PFU/Petrischale. Das Prinzip der Versuchsanordnung sei an der Versuchsreihe P G Co erläutert (Tab. 1).

Schema der Versuchsanordnung der in Abb. 3 und 4 dargestellten Versuche

Signatur der Versuchsreihe	Vorbehandlung (2 ml/Schale)	Inokulation (2 ml/Schale)	Erhaltungs- medium (5 ml/Schale)	Untersuchungstermine (5 ml/Schale)				
Zeit:	- 2 ^h	0	30'	6 ^h 45'	7 ^h	13 ^h 45'	14 ^h	21 ^h
Nm Co	1) Nm 2) Nm 3) Nm	Nm Co Nm Nm	Nm Co Nm Nm	Nm Co Nm Co Nm Co	-E	Nm Co Nm Co Nm Co	-E	-E
G Co	1) Nm G 2) Nm G 3) Nm G	Nm G Co Nm G Nm G	Nm G Co Nm G Nm G	Nm G Co Nm G Co Nm G Co	-E	Nm G Co Nm G Co Nm G Co	-E	-E
P G Co	1) Nm G 2) Nm G 3) Nm G	P Nm G Co P Nm G P Nm G	Nm G Co Nm G Nm G	Nm G Co Nm G Co Nm G Co	-E	Nm G Co Nm G Co Nm G Co	-E	-E
<u>Kontrollen:</u> Nm G	1) Nm G	-E						
G	1) Nm G	Nm G	Nm G					-E
P G	1) Nm G	P Nm G	Nm G					-E

Zeichenerklärung: Nm = Gewebekultur-Nährmedium
G = Guanidin-haltiges Medium
Co = Colchizin-haltiges Medium

P = Poliomyelitisvirus-haltiges Medium
E = Entnahme des Präparates

Diese Reihe wurde mit Poliomyelitisvirus infiziert und außerdem unter Guanidin gehalten. Die während jedes 7-Stunden-Intervalles anfallenden Mitosen wurden durch Colchizin arretiert. - Sämtliche Schalen dieser Versuchsreihe wurden zunächst mit Guanidin während eines Zeitraumes von 2 Stunden vorbehandelt (Nm G). Sodann erfolgte die Inokulation des Virus in guanidinhaltiger Lösung (P Nm G). Eine Schale dieser Reihe erhielt bereits zu diesem Zeitpunkt einen Colchizinzusatz (P Nm G Co). Nach 30 Minuten Adsorptionszeit wurde das Inokulationsmedium abgesaugt und durch virusfreies Erhaltungsmedium ersetzt, das Guanidin enthielt (Nm G). Die mit Colchizin behandelte Schale erhielt wiederum zusätzlich Colchizin (Nm G Co) und wurde zur 7. Stunde nach Infektionsbeginn fixiert (E). Die zweite Schale dieser Reihe erhielt 6 3/4 Stunden nach Infektionsbeginn den Colchizinzusatz (Nm G Co). Dies wurde dadurch erreicht, daß ein entsprechender Nährmediumwechsel vorgenommen wurde. Da die Colchizinwirkung eine gewisse Anlaufzeit hat, wurde durch diese Maßnahme erreicht, daß zum Zeitpunkt der 7. Stunde der volle Colchizineffekt bereits in Erscheinung getreten ist. Diese Schale wurde 7 Stunden später, somit zur 14. Stunde nach Infektionsbeginn, fixiert (E). Die 3. Schale dieser Reihe erhielt 13 3/4 Stunden nach Infektionsbeginn den Colchizinzusatz (Nm G Co) und wurde wiederum 7 Stunden später, somit zur 21. Stunde nach Infektionsbeginn, fixiert (E). - Eine zweite Versuchsreihe (G Co) wurde nicht mit Poliomyelitisvirus infiziert, jedoch bezüglich der Guanidin-Colchizineinwirkung in der gleichen Weise behandelt wie die erste Versuchsreihe. - Eine dritte Versuchsreihe (Nm Co) erhielt weder Poliomyelitisvirus noch Guanidin, wurde jedoch bezüglich der Colchizineinwirkung genauso gehalten wie die ersten beiden Versuchsreihen. - Als weitere Kontrollen wurde eine Versuchsreihe (P G) in der gleichen Weise mit Poliomyelitis infiziert und mit Guanidin behandelt, wie das für die erstgenannten Versuchsreihen auch geschehen ist, jedoch erfolgte kein Colchizinzusatz. Eine weitere Versuchsreihe (G) wurde nicht mit Poliomyelitisvirus infiziert, jedoch mit Guanidin behandelt, ohne Colchizinzusatz. - Eine letzte Versuchsreihe (Nm G) wurde lediglich mit Guanidin vorbehandelt und zum Inokulationszeitpunkt fixiert.

Das Ergebnis dieses Versuches ist aus der Abb. 3 zu ersehen. Die hier abgebildeten Säulen stellen die Gesamtzahl der zu den angegebenen Zeitpunkten gezählten Metaphasen dar. Bei den mit Colchizin behandelten Kulturen (durch den Zusatz Co gekennzeichnet) ist dies gleich der Gesamtzahl aller in dem vorausgegangenen 7-Std.-Intervall

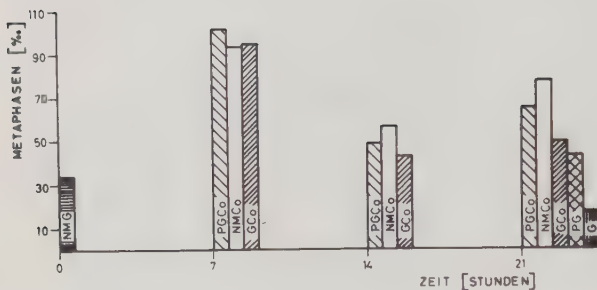


Abb. 3: Das Verhalten der Zellteilung Poliomyelitis-infizierter Kulturen unter langdauernder Guanidineinwirkung. Versuchsanordnung siehe Tab. 1 und Text. Die Säulen stellen die Höhe des Metaphaseindex dar. Bei den mit dem Zusatz Co gekennzeichneten Säulen war jeweils 7 Std. vor dem Registriertermin eine Metaphasearretierung durch Colchizin erfolgt. - Nm: Mit Nährmedium behandelte Kontrollkulturen. G und Nm G: Guanidinbehandelte Kulturen. P G: Poliomyelitisinfizierte und mit Guanidin behandelte Kulturen. - Hinweis auf das Vorliegen eines Colchizineffektes der Reihe P G, da zur 21. Stunde nach Infektionsbeginn der Metaphaseindex der Reihe P G in der gleichen Größenordnung liegt wie der der Reihen G Co und P G Co.

stattgefundenen und somit arretierten Zellteilungen. - Die Kolumne zum Zeitpunkt 0 stellt den Ausgangspunkt nach zweistündiger Guanidinvorbehandlung dar. Der Wert von 35 % Metaphasen liegt im oberen Bereich der normalen Mitoserate einer Gewebekultur. Bis zur 7. Stunde nach Infektionsbeginn zeigt sich in allen drei mit Colchizin behandelten Versuchsreihen eine deutliche Zunahme an Metaphasen, was auf eine lebhaftere Zellteilung im Intervall 0 bis 7. Stunde hinweist. Das Ausmaß der Zellteilungen ist bei diesen drei Versuchsreihen etwa gleich groß. Im Beobachtungsintervall von der 7. bis zur 14. Stunde nach Infektionsbeginn ist die gesamte Mitoserate zwar geringer, es bestehen jedoch keine wesentlichen Unterschiede innerhalb dieser drei Versuchsreihen. Lediglich die nichtinfizierte und nicht mit Guanidin behandelte Reihe (Nm Co) zeigt eine etwas stärkere Zellteilung. Zwischen der 14. und 21. Stunde hat weiterhin eine lebhaftere Zellteilung stattgefunden. In der nicht mit Virus infizierten, lediglich mit Guanidin behandelten Versuchsreihe (G Co) ist infolge der Colchizin-arretierung die Metaphaserate dreimal so hoch wie ohne Colchizinbehandlung (G). Dieser Unterschied ist für die Colchizineinwirkung charakteristisch. Abweichend hiervon ist der Unterschied in den Reihen P G Co und P G wesentlich geringer ausgeprägt, nämlich 65 zu 42 % Metaphasen. Dies weist darauf hin, daß in poliomyelitisinfizierten Kulturen unter Guanidin etwa gleiche Ergebnisse erzielt werden, als wenn zusätzlich noch Colchizin hinzugefügt worden wäre. Ein Vergleich der Reihen P G und G könnte den Schluß aufkommen lassen, daß in der infizierten Reihe (P G) eine lebhaftere Zellteilung stattfindet als in der nichtinfizierten Reihe G. Der Vergleich mit der Reihe P G Co zeigt jedoch, daß es sich hier nicht um eine echte Zunahme der Zellteilung handelt, sondern daß die Kombination von Poliomyelitisvirus und Guanidin einen Colchizin-ähnlichen Effekt hervorruft (P G ist 2,6 mal so hoch wie G).

Da P G aber nicht ganz so hoch ist wie P G Co, muß einschränkend festgestellt werden, daß ein kleiner Teil der Mitosen auch unter dieser Kombination noch zu Ende ablaufen konnte, daß somit der Colchizin-ähnliche Effekt nicht komplett ist.

Aus diesem Versuch geht jedoch nicht eindeutig hervor, von welchem Zeitpunkt an der Colchizin-ähnliche Effekt in Erscheinung tritt. Da keine weiteren Werte der Versuchsreihe P G bestimmt wurden, besteht somit die Möglichkeit, daß auch hier bereits ein partieller Colchizin-ähnlicher Effekt bestand, und daß die hohe Metaphaserate der Versuchsreihe P G Co zur 14. Stunde auch bereits ohne Colchizin durch liegen gebliebene Mitosen entstanden sein könnte.

Zur Sicherung wurde eine Wiederholung dieses Versuches vorgenommen (Abb. 4). Bezüglich der Methodik wurde in gleicher Weise verfahren, wie oben beschrieben (Tab. 1). - Die Verhältnisse im Intervall bis zur 7. Stunde sind die gleichen wie für den oben beschriebenen Versuch. Auch im Intervall zwischen der 7. und 14. Stunde bestehen im Prinzip gleiche Verhältnisse, lediglich die größere Höhe der Säule Nm Co kommt deutlicher zum Ausdruck. Zwischen der 14. und 21. Stunde findet sich, ähnlich wie im vorigen Versuch, daß die Reihen P G Co und P G eine gleich große Anzahl von Zellen in der Metaphase aufweisen. Es kommt hier noch deutlicher zum Ausdruck, daß in der nicht mit Colchizin behandelten Kultur (P G) die Metaphaserate genauso hoch ist, wie in der zusätzlich mit Colchizin behandelten Reihe P G Co. Hieraus folgt, daß in diesem Experiment ein vollständiger Colchizin-ähnlicher Effekt zwischen der 14. und 21. Stunde bestanden hat. Eine weitere Bestätigung erfährt diese Aussage durch den Befund, daß die poliomyelitisinfizierte und mit Guanidin behandelte Reihe (P G) eine 2,8 mal so große Anzahl von Metaphasen aufweist, wie die lediglich mit Guanidin behandelte Reihe (G). Die Differenz zwischen den Säulen G

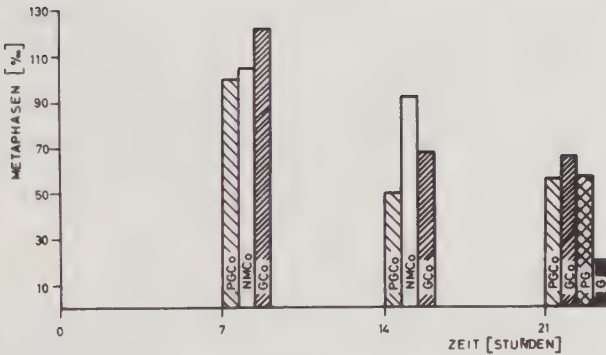


Abb. 4: Das Verhalten der Zellteilung poliomyelitisinfizierter Kulturen unter langdauernder Guanidineinwirkung. Versuchsanordnung siehe Tab. 1 und Text. Die Säulen stellen den Metaphaseindex dar. Bei den mit dem Zusatz Co gekennzeichneten Säulen war jeweils 7 Std. vor dem Registriertermin eine Metaphasearretierung durch Colchizin erfolgt. - Nm: Mit Nährmedium behandelte Kontrollkulturen. G: Mit Guanidin behandelte Kulturen. P G: Poliomyelitisinfizierte und mit Guanidin behandelte Kulturen. - Wie in Abb. 3 ist auch hier ein Colchizin-ähnlicher Effekt der Reihe P G nachweisbar, da zur 21. Stunde nach Infektionsbeginn der Metaphaseindex der Reihe P G in der gleichen Größenordnung liegt wie in den Reihen G Co und P G Co.

und G Co weist darauf hin, daß in der Reihe G die Mitosen ungestört ablaufen konnten und nur unter Colchizineinfluß (G Co) eine Ansammlung in der Metaphase erfolgt. Dies ist gleichzeitig eine Kontrolle dafür, daß die Zellteilungen zu diesem späten Versuchstermin noch ordnungsgemäß abgelaufen sind und daß auch der Colchizineffekt noch in üblicher Weise auslösbar war.

Einen wesentlichen Hinweis auf die Frage, ob ein Colchizin-ähnlicher Effekt der poliomyelitisinfizierten Kulturen unter Guanidin vorliegt, gibt das Verhalten der Telophasen. Nimmt man einen Colchizin-ähnlichen Effekt dieser Versuchskombination an, so ist zu fordern, daß die Zellen in der Metaphase liegen bleiben und somit die Anzahl der Zellen in der Telophase deutlich vermindert ist. Das Verhalten der Telophasen der beiden beschriebenen Experimente ist in der Tabelle 2 dargestellt. Es ergibt sich, daß in den beiden Experimenten die Anzahl der Telophasen der Versuchsreihe P G in der gleichen Größenordnung liegt, wie in den Versuchsreihen, die mit Colchizin zusätzlich behandelt worden sind (Nm Co, G Co und P G Co). Dagegen findet sich in der lediglich mit Guanidin behandelten Versuchsreihe (G) eine normal hohe Anzahl von Telophasen. Die Anzahl der Telophasen der Versuchsreihe G ist bis um das 45fache höher als diejenige der Reihe P G.

2) Beweis für den Colchizin-ähnlichen Effekt durch Untersuchungen in kürzeren Zeitabständen.

Bei den bisherigen 7stündigen Beobachtungsintervallen wurde jeweils nur der Endpunkt registriert. Der Ausgangswert fehlte, so daß die Zunahme während des Beobachtungszeitraumes nicht exakt beurteilt werden konnte. Es sollte deshalb die Frage geklärt werden, ob die zur 21. Stunde

Tabelle 2

Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes durch
Bestimmung des Telophaseindex

Exper.Nr.	Nm Co	G Co	P G Co	P G	G
1142	1,66	1,33	0,33	0,33	7,33
1152	--	3,0	0	0,33	15,0

Telophasen (%) 21 Stunden nach Einwirkung von Guanidin (G) oder zusätzlicher Infektion mit Poliovirus (P G). Bei der mit Nm bezeichneten Reihe handelt es sich um eine nichtbehandelte Kontrollkultur. Die mit dem Symbol Co bezeichneten Versuchsreihen erhielten zusätzlich Colchizin. - In der Reihe P G ist die Zahl der Telophasen ebenso gering wie in den mit Colchizin behandelten Versuchsreihen. Bei der nur mit Guanidin behandelten Versuchsreihe (G) findet sich ein normaler Telophaseindex.

in den Reihen P G und P G Co aufgefundenen Metaphasen im Zeitintervall zwischen der 14. bis 21. Stunde neu entstanden, oder vom vorherigen Zeitabschnitt liegen geblieben sind. Bei den folgenden beiden Versuchen wurde deshalb so verfahren, daß der Beobachtungszeitraum zwischen der 14. und 22. Stunde durch 4 bzw. 5 Untersuchungstermine unterteilt wurde.

In Plastik-Petrischalen auf Deckgläsern angezüchtete Gewebekulturen von KB-Zellen wurden 2 Stunden vor der Virusinokulation mit Guanidin vorbehandelt. Hierfür wurde Guanidin in einer Endkonzentration von 250 µg/ml verwendet. Anschließend wurde ein Teil der Kulturen mit Polio-myelitisvirus infiziert (Infektionsmultiplizität 130 PFU/Zelle). Bei den übrigen, nichtinfizierten Reihen wurde ein Nährmediumwechsel vorgenommen, wie aus der Tab. 3 zu ersehen ist. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten wurde das Nährmedium gewechselt und durch Erhaltungsmedium ersetzt, das bis zur 14. Stunde nach Infektionsbeginn unverändert belassen wurde. Wie aus Tab. 3 ersichtlich, wurde zu diesem Zeitpunkt aus jeder Versuchsreihe

ein Deckglas fixiert. Die restlichen Kulturen wurden mit Colchizin behandelt. Dies erfolgte in der Art, daß ein Nährmediumwechsel mit Colchizin-haltigem Medium vorgenommen wurde, das außerdem Guanidin enthielt. Zu den aus der Tab. 3 und den Abb. 5 und 6 ersichtlichen Terminen wurde je ein Deckglas fixiert.

Wie aus der Abb. 5 ersichtlich, findet in den Guanidin-behandelten Kontrollkulturen (G Co) eine lebhafte, kontinuierliche Zellteilung statt. Dies kommt in dem steilen Anstieg der Kurve zum Ausdruck. Bei der poliomyelitis-infizierten, mit Guanidin behandelten und durch Colchizin arretierten Versuchsreihe (P G Co) weist der Ausgangswert zur 14. Stunde nach Infektionsbeginn bereits einen doppelt so hohen Metaphasewert auf, wie die Kontrollreihe G Co. Der nachfolgende Anstieg der Kurve bis zur 22. Stunde nach Infektionsbeginn ist deutlich flacher als derjenige der Reihe G Co. Hieraus folgt, daß der größte Teil der in dieser Versuchsreihe aufgefundenen Mitosen bereits zum Zeitpunkt der 14. Stunde vorhanden war, somit von früheren Stadien des Infektionsablaufes her liegen geblieben ist. Weiterhin zeigt sich, daß in der Reihe P G Co zwischen der 14. und 22. Stunde nach Infektionsbeginn nur eine geringe Zunahme an Mitosen stattfindet. - In der nicht durch Colchizin arretierten, poliomyelitisinfizierten und mit Guanidin behandelten Versuchsreihe (P G) fällt ebenfalls ein sehr hoher Ausgangswert zur 14. Stunde nach Infektionsbeginn auf. Zur 21. Stunde nach Infektionsbeginn liegt der Wert der Reihe P G in der gleichen Größenordnung wie derjenige der Reihe P G Co. Der Verlauf der Kurven zeigt, daß der Mitoseablauf der Reihe P G im wesentlichen gleich dem der Reihe P G Co ist. Auch dies gibt einen Hinweis auf das Vorhandensein einer Colchizin-ähnlichen Wirkung der Kombination Poliomyelitisvirus plus Guanidin. Einschränkung ist jedoch festzustellen, daß die Kurve der Versuchsreihe P G nur aus zwei Meßpunkten besteht und darüberhinaus der Meßpunkt zur 14. Stunde ungewöhnlich

Tabelle 3
Schema der Versuchsanordnung der in Abb. 5 und 6 dargestellten Versuche

Signatur der Versuchsreihe	Vorbehandlung (2 ml/Schale)	Inokulation (2 ml/Schale)	Erhaltungsmedium (5 ml/Schale)	Untersuchungstermine (5 ml/Schale)				
				14 ^h	17 ^h	19 ^h	21 ^h	
Zeit:	- 2 ^h	0	30'					
G Co	1) Nm G	Nm G	Nm G	---E				
	2) Nm G	Nm G	Nm G	Nm G Co	---E			
	3) Nm G	Nm G	Nm G	Nm G Co	---E	---E		
	4) Nm G	Nm G	Nm G	Nm G Co	---E	---E	---E	
P G Co	1) Nm G	P Nm G	Nm G	---E				
	2) Nm G	P Nm G	Nm G	Nm G Co	---E			
	3) Nm G	P Nm G	Nm G	Nm G Co	---E	---E		
	4) Nm G	P Nm G	Nm G	Nm G Co	---E	---E	---E	
P G	1) Nm G	P Nm G	Nm G	---E				
	2) Nm G	P Nm G	Nm G	Nm G	---E			

Zeichenerklärung: Nm = Gewebekultur-Nährmedium
G = Guanidin-haltiges Medium
Co = Colchizin-haltiges Medium
P = Poliomyelitisvirus-haltiges Medium
E = Entnahme des Präparates

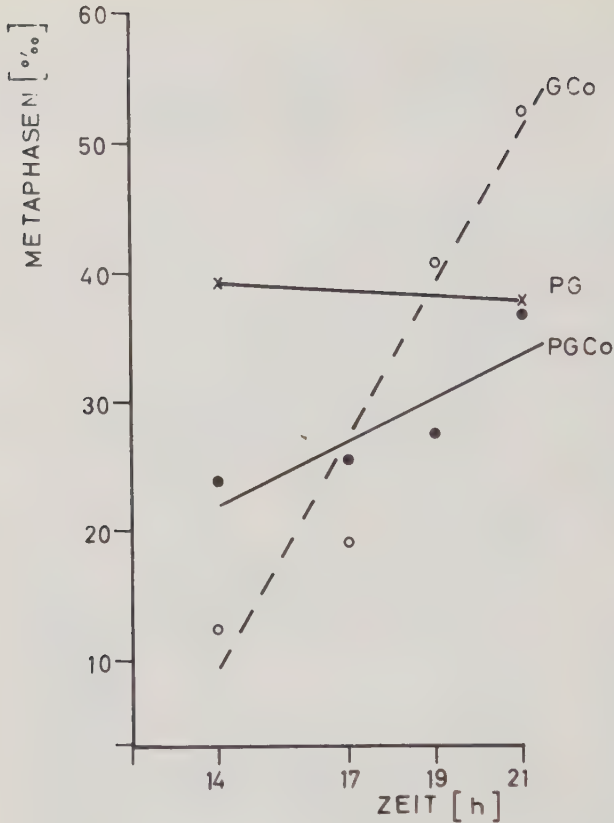


Abb. 5: Colchizin-ähnlicher Effekt in polioinfizierten Zellen unter Guanidineinwirkung. Die durch Guanidin gehemmte Infektion (P G) beginnt zum Zeitpunkt 0. Die Reihen P G Co und G Co erhalten außerdem zur 14. Stunde p.i. Colchizin. Versuchsanordnung siehe Tab. 3 und Text. Das gleichsinnige Verhalten und der fehlende Anstieg der Kurven P G und P G Co weisen darauf hin, daß in diesem Untersuchungsintervall fast keine Zellen in die Metaphase eingetreten sind. Die noch nachweisbaren Metaphasen lagen bereits zur 14. Stunde p.i. in arretierter Form vor. Es handelt sich somit um einen Colchizin-ähnlichen Effekt.

hoch liegt. Aus diesem Grunde wurde der Versuch unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die Durchführung dieses Versuches geht aus der Tab. 3 hervor und entspricht in allen experimentellen Einzelheiten dem vorigen Versuch.

Das Ergebnis ist in der Abb. 6 dargestellt. Auch in diesem Versuch findet während des Beobachtungsintervalles in der nicht mit Virus infizierten, lediglich mit Guanidin behandelten und durch Colchizin arretierten Kontrollreihe (G Co) eine lebhaftete Zellteilung statt. Dies geht aus dem steilen und kontinuierlichen Anstieg dieser Kurve hervor. Die poliomyelitisinfizierte, guanidinbehandelte und durch Colchizin arretierte Versuchsreihe (P G Co) zeigt einen annähernd waagerechten Kurvenverlauf. Der Ausgangswert dieser Kurve ist zur 14. Stunde nach Infektionsbeginn 1,4 mal so hoch wie derjenige der Guanidinbehandelten Kontrolle (G Co). Aus dem waagerechten Verlauf der Kurve P G Co folgt, daß während des Untersuchungszeitraumes zwischen der 14. und 21. Stunde nach Infektionsbeginn keine Mitosen neu dazugetreten sind. Die poliomyelitisinfizierte, mit Guanidin behandelte, aber nicht durch Colchizin arretierte Reihe (P G) ergibt einen gleichen Kurvenverlauf wie die Reihe P G Co.

Dieses Versuchsergebnis beweist, daß es sich bei den zur 22. Stunde nach Infektionsbeginn nachweisbaren Mitosen der Versuchsreihe P G um solche handelt, die bereits zur 14. Stunde nach Infektionsbeginn in der Metaphase vorlagen und während des Beobachtungszeitraumes von 8 Stunden nicht in die Ana- bzw. Telophase übertreten konnten.

3) Der Zeitpunkt des Auftretens des Colchizin-ähnlichen Effektes.

Aus den vorhergehenden Versuchen ergab sich die Frage, bis zu welchem Zeitpunkt in poliomyelitisinfizierten

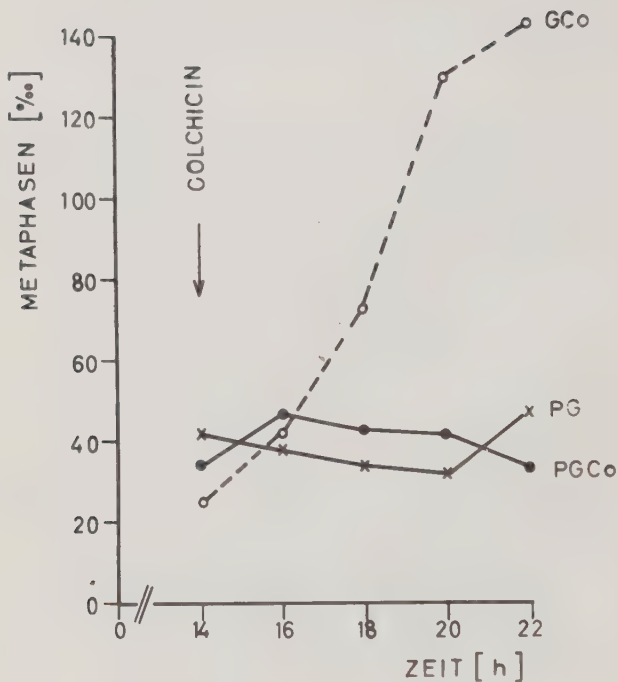


Abb. 6: Colchizin-ähnlicher Effekt in polioinfizierten Zellen unter Guanidineinwirkung. Wiederholung des in Abb. 5 beschriebenen Versuches. Die durch Guanidin gehemmte Infektion (P G) beginnt zum Zeitpunkt 0. Die Reihen P G Co und G Co erhalten außerdem zur 14. Std. p.i. Colchizin. Versuchsanordnung siehe Tab. 3 und Text. - Das gleichartige Verhalten und der fehlende Anstieg der Kurven P G und P G Co kommt hier deutlich zum Ausdruck. Dies beweist, daß in diesem Untersuchungsintervall keine Zellen in die Metaphase eingetreten sind. Die noch nachweisbaren Metaphasen lagen bereits zur 14. Stunde p.i. in arretierter Form vor. Es handelt sich somit um einen Colchizin-ähnlichen Effekt.

und mit Guanidin behandelten Kulturen noch Zellen in die Mitose eintreten können. Es wurden deshalb drei Versuchsreihen angesetzt, die vom Infektionsbeginn an bis zur 12. Stunde untersucht wurden.

KB-Zellen in Falcon-Petrischalen mit Deckgläsern wurden zunächst 2 Stunden mit einem Nährmedium vorbehandelt, dem Guanidin in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt war. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte in zwei Versuchsreihen die Infektion mit Poliomyelitisvirus (Infektionsmultiplizität 1000 PFU/Zelle). Gleichzeitig wurde zwei Versuchsreihen Colchizin zugesetzt (P G Co und G Co) in einer Endkonzentration von 0,025 $\mu\text{g/ml}$. Zu den aus der Abb. 7 ersichtlichen Terminen wurde aus jeder Versuchsreihe ein Deckglas fixiert.

Das Ergebnis dieses Versuches ist aus der Abb. 7 zu ersehen. Unter dem Einfluß von Guanidin und Colchizin (G Co) kommt es zu einem steilen, annähernd linearen Anstieg der Metaphasezahl, was für eine weitgehend konstante Mitoserate in der Gewebekultur spricht. Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen, bei denen späte Zeitabschnitte erfaßt wurden, findet sich in der Poliomyelitis-infizierten, mit Guanidin behandelten und durch Colchizin arretierten Versuchsreihe (P G Co) eine echte Zunahme der Zellteilung bis zur 10. Stunde nach Infektionsbeginn. Hinzu kommt, daß zwischen der 2. und 8. Stunde nach Infektionsbeginn in den infizierten Kulturen eine stärkere Zellteilung registrierbar ist, als in den nur mit Guanidin behandelten Kontrollkulturen. Nach der 10. Stunde kommt es in der Reihe P G Co zu einem Abfall der Metaphaserate. Der Abfall der Metaphaserate in einer Colchizin-arretierten Kultur ist zunächst nicht erklärbar. In diesem Falle kommt es jedoch unter der gleichzeitigen Einwirkung von Poliomyelitisvirus, Guanidin und Colchizin zu einer toxischen Schädigung, die zu einer Ablösung der Zellen vom Deckglas und somit zu einer Verminderung der Zellzahl führt; auch die Zahl der in der Metaphase arretierten Zellen geht so

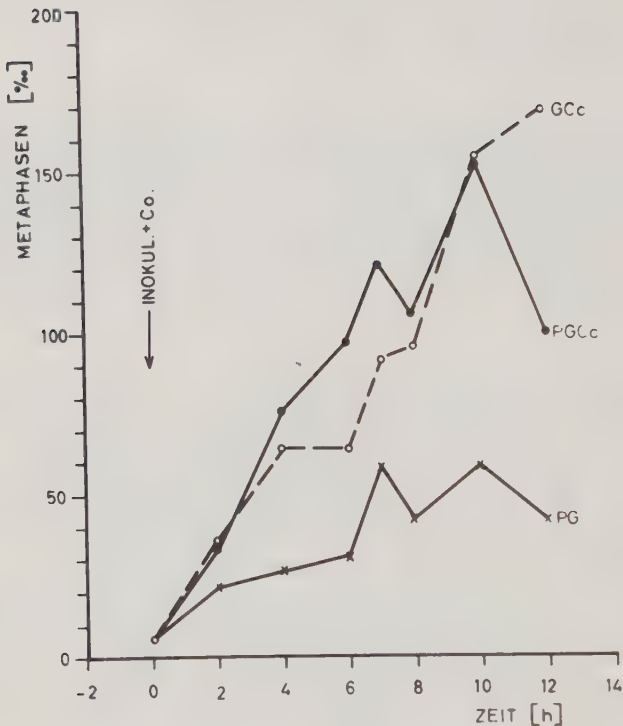


Abb. 7: Beginn des Colchizin-ähnlichen Effektes. Versuchsanordnung siehe Text. - G: Guanidinbehandlung nichtinfizierter Kulturen. P G: Polioinfizierte Kulturen unter Guanidinbehandlung. Die mit dem Symbol Co gekennzeichneten Versuchsreihen erhielten zum Zeitpunkt 0 einen Zusatz von Colchizin. - Der Anstieg des Metaphaseindex der Reihe P G bis zur 7. Stunde p.i. und das hohe Niveau der Kurve mit Werten um 50 % deuten darauf hin, daß trotz der echten Zunahme der Zellteilung, wie sie aus der Reihe P G Co hervorgeht, ein beginnender Colchizin-ähnlicher Effekt in Erscheinung tritt. Trotzdem kann die Mehrzahl der Zellen den Mitosezyklus noch beenden, wie aus dem steilen Verlauf der Kurve P G Co bis zur 10. Stunde p.i. hervorgeht.

zurück. - In den mit Poliomyelitisvirus infizierten und mit Guanidin behandelten Kulturen (P G) kommt es bis zur 7. Stunde nach Infektionsbeginn zu einem Anstieg der Anzahl der Metaphasen, danach stellt sich ein Niveau ein mit Metaphasewerten um 50 %. Der Anstieg bis zur 7. Std. und die hohe Mitosezahl der Reihe PG deuten darauf hin, daß trotz der echten Zunahme an Zellteilungen, wie sie aus der Reihe P G Co hervorgehen, ein beginnender Colchizin-ähnlicher Effekt in zunehmendem Maße in Erscheinung tritt. Daß trotz des beginnenden Colchizin-ähnlichen Effektes die Mehrzahl der Zellen den Mitosezyklus noch beenden kann, geht aus dem relativ steilen Verlauf der Kurve der Reihe P G Co - bis zur 10. Stunde - hervor.

Das Einsetzen des Colchizin-ähnlichen Effektes läßt sich weiterhin an Hand des Auftretens von Mitoseanomalien erfassen. Von der 6. Stunde nach Infektionsbeginn an treten in vermehrtem Maße Metaphasen mit abgesprengten oder regellos liegenden Chromosomen auf. Bis zur 12. Stunde nehmen diese Mitoseanomalien zahlenmäßig zu und bleiben dann unverändert.

Wie aus den vorhergehenden Versuchen abzuleiten ist, hat sich bis zur 14. Stunde nach Infektionsbeginn ein Zustand eingestellt, in dem praktisch keine neuen Zellen mehr in die Mitose eintreten, andererseits jedoch die in der Metaphase befindlichen Zellen den Mitosezyklus nicht mehr beenden können und deshalb über längere Zeit im Stadium der Metaphase liegen bleiben.

III. Mitoseanomalien nach Hemmung der Poliomyelitis- reproduktion durch Guanidin

Die bisherigen Untersuchungen haben ergeben, daß während der späten Stadien einer durch Guanidin gehemmten Poliomyelitisinfektion einerseits keine neuen Zellen mehr in die Mitose eintreten können, andererseits die in der Metaphase befindlichen Zellen in diesem Stadium über einen längeren Zeitraum liegen bleiben. Das Ziel weiterer Untersuchungen war es, die Häufigkeit von Mitoseanomalien quantitativ zu erfassen. Gleichzeitig sollte die Bedeutung des Guanidins hierfür vergleichsweise untersucht werden.

Die Untersuchungen wurden mit KB-Zellen durchgeführt, die in üblicher Weise in Petrischalen auf Deckgläsern gezüchtet worden waren. Nach einer zweistündigen Vorbehandlung unter Guanidin in den entsprechenden Konzentrationen wurden die Kulturen unter Guanidineinwirkung mit Poliomyelitisvirus infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten wurde die Inokulationsflüssigkeit durch ein Erhaltungsmedium mit 10 % Kälberserum ersetzt, das wiederum die entsprechenden Konzentrationen an Guanidin enthielt. 24 Stunden nach Infektionsbeginn wurden die Deckgläser entnommen und die Zellen fixiert. Bei diesen Präparaten wurde einerseits in üblicher Weise die Mitoserate für die einzelnen Mitosestadien getrennt bestimmt. Andererseits wurde eine Differenzierung derart vorgenommen, daß unterschieden wurden: Normale Metaphasen; Metaphasen, bei denen einzelne Chromosomen aus dem Verband herausgelöst waren; Metaphasen mit regellos über die ganze Zelle verteilten Chromosomen. - Chromosomale Aberrationen wurden bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt. - In einer ersten Versuchsreihe wurden Poliomyelitis-infizierte Gewebekulturen mit steigenden Guanidinkonzentrationen behandelt. Bereits bei Anwendung einer Guanidinkonzentration von 100 µg/ml ist in den infizierten Zellen der zytopathische Effekt weitgehend aufgehoben. Auch bei höheren Guanidinkonzentrationen erscheinen die Zellen morphologisch intakt.

Das Ergebnis dieses Experimentes ist in den Tab. 4, 5 und 6 und den Abb. 8 und 9 dargestellt. Als Bestätigung der vorangegangenen Versuche ergibt sich auch hier eine wesentlich höhere Rate an Metaphasen bei der Poliomyelitis-infizierten, mit Guanidin behandelten Reihe gegenüber der

Tabelle 4

Verhalten der Mitosen Polio-infizierter Zellen in Abhängigkeit
von der Guanidinkonzentration

Guanidin- konzentr. ($\mu\text{g/ml}$)	Prophasen	Metaphasen				Anaphasen	Telophasen
		Gesamt	Normal	Absprengung	regellos		
100	0,3	47,4	11,7 = 24,7 %	31,0 = 65,5 %	4,7 = 9,8 %	0,7	7,3
200	0,3	46,6	12,3 = 26,5 %	28,0 = 60,1 %	6,3 = 13,4 %	1,0	6,3
300	0,7	31,0	8,7 = 28,0 %	20,3 = 65,4 %	2,0 = 6,4 %	0,3	7,0
400	0,3	25,0	7,0 = 28,0 %	13,0 = 52,0 %	5,0 = 20,0 %	0,7	5,0
500	0,7	22,6	6,0 = 26,5 %	14,3 = 63,3 %	2,3 = 10,2 %	0,3	8,3
600	0	21,7	5,3 = 24,4 %	14,7 = 67,7 %	1,7 = 7,9 %	0,3	8,3
700	0	16,3	4,0 = 24,5 %	10,0 = 61,4 %	2,3 = 14,1 %	0,7	7,3
800	0	14,4	3,7 = 25,7 %	8,7 = 60,4 %	2,0 = 13,9 %	0,3	11,0

Mitosen in %. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Gesamtzahl der Metaphasen.

Tabelle 5

Verhalten der Mitosen in nicht infizierten Kontrollkulturen
in Abhängigkeit von der Guanidinkonzentration

Guanidin- konzentr. ($\mu\text{g/ml}$)	Prophasen	Metaphasen	Anaphasen	Telophasen
Kontrolle	6,3	35,6	7,0	20,7
100	10,0	34,3	3,3	18,7
200	6,0	25,3	3,7	17,0
300	6,3	19,7	3,0	16,7
400	6,7	26,0	1,3	12,3
500	0,7	14,3	3,0	11,3
600	1,0	6,0	1,0	10,0
700	1,3	5,3	1,0	13,3
800	1,0	4,7	0,3	10,3

Angabe des Mitoseindex in ‰.

Tabelle 6

Häufigkeit von Mitoseanomalien nicht infizierter
Kontrollkulturen in Abhängigkeit von der Guanidin-
konzentration

Guanidin- konzentr. ($\mu\text{g/ml}$)	Metaphasen		
	Normal	Abspregung	regellos
Kontrolle	180 = 90,0 %	5 = 2,5 %	15 = 7,5 %
100	177 = 88,5 %	9 = 4,5 %	14 = 7,0 %
200	168 = 84,0 %	11 = 5,5 %	21 = 10,5 %
300	161 = 80,5 %	20 = 10,0 %	19 = 9,5 %
400	162 = 81,0 %	19 = 9,5 %	19 = 9,5 %
500	164 = 82,0 %	18 = 9,0 %	18 = 9,0 %
600	151 = 75,5 %	21 = 10,5 %	28 = 14,0 %
700	155 = 77,5 %	24 = 12,0 %	21 = 10,5 %
800	70 = 70,0 %	22 = 22,0 %	8 = 8,0 %

Es wurden jeweils 200 Metaphasen differenziert.
Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf
die gesamten Metaphasen.

lediglich mit Guanidin behandelten Kontrollreihe. Wie bereits erwähnt, beruht dies darauf, daß während der späten Stadien des Infektionsablaufes bei Poliomyelitis-infizierten, mit Guanidin behandelten Kulturen der Mitosezyklus nicht beendet werden kann, sondern die Zellen im Stadium der Metaphase arretiert werden. Bei einer Guanidinkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ liegt die Metaphase-rate der infizierten Kulturen gegenüber den nur mit Guanidin behandelten Kontrollen um 38 % höher (Abb. 8 und 9). Ähnliche Verhältnisse bestehen auch bei höheren Guanidinkonzentrationen. Wie aus der Tab. 4 und der Abb. 8 hervorgeht, fällt mit steigenden Guanidinkonzentrationen die Gesamtzahl der Metaphasen auch in den infizierten Kulturen langsam ab.

Der Anteil der Metaphasen mit abgesprengten Chromosomen an der Gesamtzahl an Metaphasen ist in infizierten Kulturen bei allen Guanidinkonzentrationen etwa gleich und liegt in der Größenordnung im Mittel um 62 %. Der Anteil an Metaphasen mit regellos verteilt liegenden Chromosomen an der Gesamtzahl der Metaphasen beträgt im Mittel 12 % und bleibt mit zunehmender Guanidinkonzentration etwa gleich (Tab. 4).

Vergleichsweise hierzu wurde eine nicht infizierte Kontrollreihe 23 Stunden lang lediglich mit Guanidin behandelt (Tab. 5 und 6, Abb. 9). Auch hier findet sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Gesamtzahl an Metaphasen. Ein deutlicher Unterschied zwischen dieser Kontroll- und der virusinfizierten Versuchsreihe besteht darin, daß die Zahl der Metaphasen mit abgesprengten oder regellosen Chromosomen bei den infizierten Kulturen wesentlich höher ist. Wie aus dem Kurvenverlauf der Abb. 9 hervorgeht, besteht keine Abhängigkeit dieser Mitoseanomalien von der Konzentration des Guanidins.

Das Verhältnis der Gesamtzahl der Metaphasen der infizierten

Guanidin-behandelten Versuchsreihe (P G) zu denen der nicht infizierten, Guanidin-behandelten Kontrollreihe (G) (Quotient der Metaphaserate $P G / G$) nimmt mit steigender Guanidinkonzentration von 1,38 auf 3,04 zu (Tab. 7). Diese Tatsache weist darauf hin, daß neben der Hemmung der Zellteilung durch steigende Guanidinkonzentrationen eine relative Zunahme der Mitosen in der Versuchsreihe P G auftritt. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorhergehend beschriebenen Versuche ist dies ein weiterer Hinweis auf den Colchizin-ähnlichen Effekt der Kombination einer Poliomyelitisvirusinfektion mit einer Guanidin-Inhibition. Der Anstieg des Quotienten $P G / G$ mit steigender Guanidinkonzentration weist weiter darauf hin, daß das Guanidin einen wesentlichen Faktor bei der Auslösung des Colchizin-ähnlichen Effektes darstellt.

Wie bei den bisherigen Versuchen gezeigt wurde, tritt ein Colchizin-ähnlicher Effekt nur bei der Kombination der Virusinfektion mit dem Guanidin auf, nicht jedoch bei Anwendung von Guanidin allein. Es ergab sich deshalb die Frage, ob auch lediglich unter den Bedingungen einer Poliomyelitisvirusinfektion ein Colchizin-ähnlicher Effekt nachweisbar ist. Eine Einschränkung erfährt dieser Vergleich dadurch, daß eine lediglich mit Poliomyelitis infizierte Gewebekultur nur über einen kurzen Zeitraum, maximal bis zu 5 Stunden, beobachtet werden kann, da von diesem Zeitpunkt an zytopathische Veränderungen auftreten.

In einem weiteren Versuch wurden Gewebekulturen aus Fl-Zellen in Falcon-Petrischalen mit Deckgläsern in üblicher Weise mit Poliomyelitisvirus infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten wurde das Inokulum abgesaugt und durch Erhaltungsmedium ersetzt. 2 Stunden nach Infektionsbeginn wurden die Zellen fixiert, gefärbt und zytologisch untersucht. Bei diesem Experiment wurde eine Versuchsreihe mit einer Infektionsmultiplizität von 1000 PFU/Zelle, eine weitere mit 500 PFU/Zelle angesetzt. Je Präparat wurden 200 Metaphasen registriert und im Hinblick auf Anomalien differenziert.

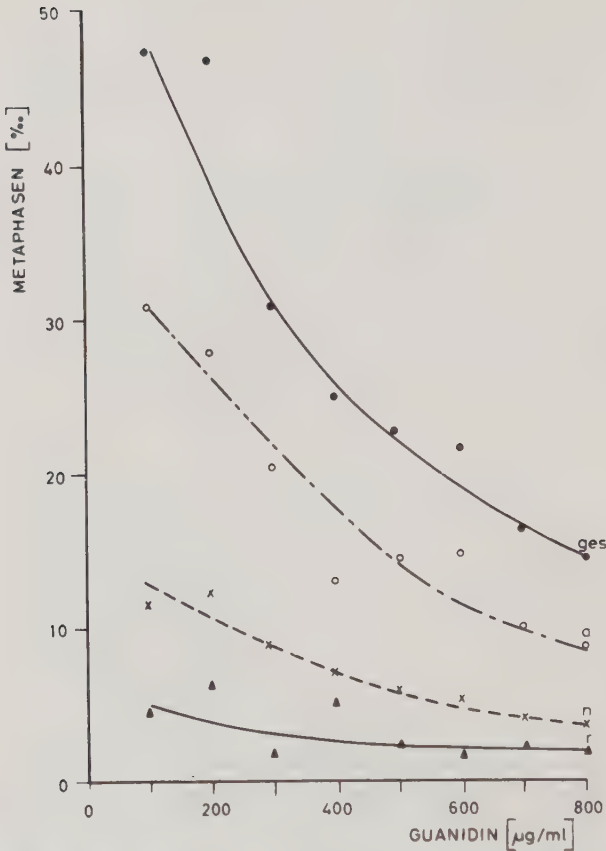


Abb. 8: Häufigkeit der Zellteilungen und der Mitoseanomalien Polio-infizierter Kulturen in Abhängigkeit von der Guanidinkonzentration. Untersuchung nach 23stündiger Guanidineinwirkung, 21 Stunden nach der Infektion. ●— ges.; Gesamtzahl der Metaphasen. X---- n: normale Metaphasen. O---- a: Metaphasen mit abgesprengten Chromosomen. ▲— r: Metaphasen mit regellos liegenden Chromosomen. - Im Gegensatz zur Abb. 9 ist unter dem zusätzlichen Einfluß der Polioinfektion der Anteil an Mitoseanomalien wesentlich erhöht. Dies trifft besonders zu für Mitosen mit abgesprengten Chromosomen. Die Gesamtzahl der Metaphasen ist gegenüber der nicht infizierten Kontrolle (Abb. 9) um mehr als 30 % erhöht. Es besteht eine Abhängigkeit der Gesamtzahl der Metaphasen von der Guanidinkonzentration.

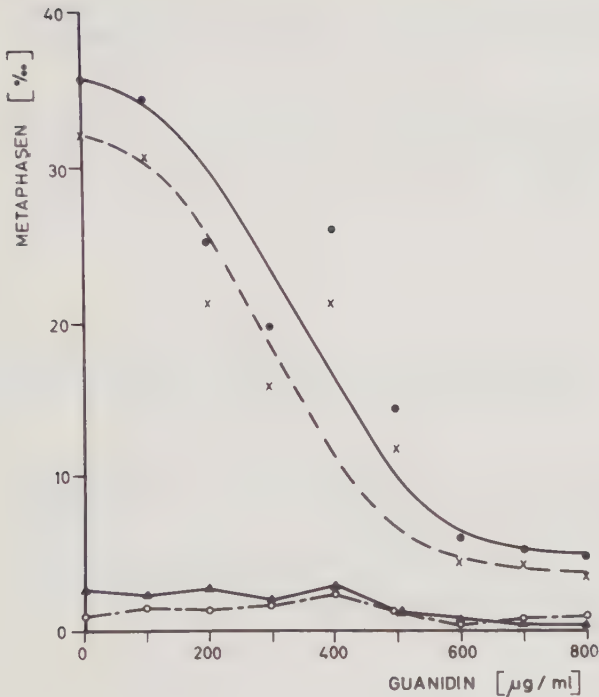


Abb. 9: Häufigkeit der Zellteilungen und der Mitoseanomalien in Abhängigkeit von der Guanidinkonzentration. Untersuchung nach 23stündiger Einwirkung der Substanz. ●— ges.: Gesamtzahl der Metaphasen. X----- n: normale Metaphasen. O----- a: Metaphasen mit abgesprengten Chromosomen. ▲— r: Metaphasen mit regellos liegenden Chromosomen. — Die Häufigkeit der Zellteilungen nimmt oberhalb von 200 µg/ml mit steigender Guanidinkonzentration ab. Die Mitoseanomalien liegen im Normbereich einer unbehandelten Kontrollkultur.

Tabelle 7

Verhältnis der Metaphasen in den Versuchsreihen P G
und G in Abhängigkeit von der Guanidinkonzentration

Guanidin- konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Quotient der Metaphaseindices P G/G
100	1,38
200	1,84
300	1,67
400	0,96
500	1,58
600	3,62
700	3,07
800	3,04

Die Werte wurden den Tab. 4, 5 und 6 entnommen. Die Zunahme des Quotienten mit steigender Guanidinkonzentration weist auf den Colchizin-ähnlichen Effekt der Versuchsreihe P G hin.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Tab. 8 zusammengestellt. Es zeigt sich, daß 2 Stunden nach Infektionsbeginn die Zahl der Metaphasen mit abgesprengten oder regellos liegenden Chromosomen in der Größenordnung der nicht infizierten Kontrollkulturen liegt. Hieraus ergibt sich, daß eine Poliomyelitisinfektion allein auch bei Anwendung hoher Infektionsmultiplizitäten nicht zur Ausbildung eines Colchizin-ähnlichen Effektes Anlaß gibt.

Tabelle 8

Häufigkeit von Mitoseanomalien in den frühen Stadien einer Polioinfektion ohne Einwirkung von Guanidin

Infektionsmultiplizität (PFU/Zelle)	Metaphasen		
	Normal	Absprengung	regellos
0 (Kontrolle)	168 = 84,0 %	17 = 8,5 %	15 = 7,5 %
500	175 = 87,5 %	11 = 5,5 %	14 = 7,0 %
1000	170 = 85,0 %	15 = 7,5 %	15 = 7,5 %

Differenzierung von je 200 Metaphasen 2 Stunden nach Infektionsbeginn. Auch mit hohen Infektionsmultiplizitäten ist die Häufigkeit von Mitoseanomalien gleich der in nicht infizierten Kontrollkulturen. Es besteht kein Colchizin-ähnlicher Effekt.

D i s k u s s i o n

Es konnte gezeigt werden, daß in Poliomyelitisvirus-infizierten Gewebekulturen unter der Einwirkung von Guanidin noch bis zur 10. Stunde nach Infektionsbeginn eine lebhaftige Zellteilung stattfindet, die das Ausmaß der lediglich mit Guanidin behandelten, nicht infizierten Kontrollkulturen deutlich übertrifft.

In den späteren Stadien des Infektionsablaufes zeigt sich bei den infizierten, Guanidin-behandelten Kulturen eine Störung des Mitoseablaufes. Ein Teil der Mitosen bleibt im Stadium der Metaphase liegen und kann den Mitosezyklus nicht beenden. Zur 14. Stunde p.i. ist diese Mitosearretierung in der Metaphase weitgehend komplett. Als weiterer Befund ergab sich, daß in diesem Infektionsstadium keine neuen Zellen mehr in die Mitose eintreten. Dieser Zustand ist bis zur 22. Stunde nach Infektionsbeginn unverändert zu beobachten.

Die Hemmung des Mitoseablaufes in den infizierten, mit Guanidin behandelten Kulturen bietet das Bild eines Colchizin-ähnlichen Effektes. Es finden sich in einem hohen Prozentsatz pathologische Metaphaseplatten mit zahlreichen abgesprengten oder regellos liegenden Chromosomen. Dieser Effekt entsteht lediglich bei längerdauernder Hemmung einer Poliomyelitisinfektion durch Guanidin. Nur mit Guanidin behandelte oder nur mit Poliomyelitisvirus infizierte Kulturen zeigen diese Mitoseanomalie nicht.

Einfluß von Virusinfektionen auf die Zellteilung

Im Verlaufe von Virusinfektionen wird der Stoffwechsel der Zelle derart umgeleitet, daß anstelle der zelleigenen

Bausteine jetzt Virusprotein und Virusnukleinsäure gebildet werden. Darüberhinaus werden auch solche Stoffwechselvorgänge der Zelle verändert, die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Synthese der Viruspartikel stehen. Zum Beispiel wird bei der Infektion mit Picornaviren die DNS-Synthese der Zelle weitgehend gehemmt. Diese Stoffwechselumleitungen führen nicht nur zu morphologischen Veränderungen, sondern sie beeinflussen auch die Zellteilung. So kann es einerseits zu einer Hemmung der Zellteilung kommen, andererseits zu einer Steigerung. Eine weitere Möglichkeit besteht in Störungen des Mitoseablaufes oder in Änderungen der Chromosomenstruktur. Diese Veränderungen sind auch von praktischer Bedeutung, weil Virusinfektionen nicht unbedingt zum Zelltod führen müssen, und es so zu einem langdauernden Einfluß auf die Zellteilung kommen kann. Hierher gehören auch die Probleme der virusbedingten Onkogenese, wenngleich die Ergebnisse dieser Arbeit hierauf keinen Bezug haben.

In der Mehrzahl der Fälle führt die Virusinfektion einer Zelle zur Hemmung der Mitose. Hierbei wird der Eintritt aus der Interphase in die Prophase unterbunden. Es liegen nur wenige systematische Untersuchungen hierüber vor. Quantitative Untersuchungen wurden von STOKER et al. (1959 a, b) und WILDY et al. (1961) durchgeführt. Nach Infektion von HeLa-Zellen mit Herpes-simplex-Virus war eine nahezu vollständige Hemmung der Zellteilung zu beobachten. Auch nach Infektion von HeLa-Zellen mit Influenzavirus oder mit Newcastle-disease-Virus fand sich ein kontinuierlicher Abfall der Mitoserate (WHEELLOCK et al. (1959)). Nach Infektion von Ovarzellen des chinesischen Hamsters mit Mengovirus ergab sich aus der Bestimmung der Zellzahl, daß im Zusammenhang mit einer kompletten Hemmung der Proteinsynthese auch eine vollständige Hemmung der Zellteilung besteht. Nach Infektion von Mäusefibroblasten mit Ektromelievirus ist eine vorübergehende Arretierung der

Mitosen im Stadium der Prophase zu beobachten; diese löst sich im weiteren Infektionsablauf wieder und die Zellen können den Mitosezyklus beenden. Unabhängig hiervon wird später der Eintritt von Zellen aus der Interphase in die Mitose unterbunden (MOON (1962), HABERMEHL et al. (1962 a, b)). Eine weitgehende Hemmung der Zellteilung konnte nach Infektion verschiedener Zellsysteme mit Vaccinia-Virus und Vesicularstomatitis-Virus beobachtet werden (HABERMEHL et al. (1966)). Die gleichen Autoren fanden nach Infektion mit Parainfluenza-Virus 3 und ME-Virus zwar zunächst noch eine temporäre Zunahme der Zellteilung, diese blieb jedoch stets unter den Werten der Kontrollkulturen.

Auf Grund halbquantitativer Untersuchungen oder gelegentlicher Beobachtungen gewannen eine Reihe anderer Autoren Hinweise auf eine Hemmung der Zellteilung durch Virusinfektionen. Eine Verminderung der Mitosehäufigkeit fanden PAUCKER et al. (1962 a, b), PAUCKER (1963) und CANTELL et al. (1962) bei L-Stammzellen nach Infektion mit Vesikularstomatitis-Virus. Weiterhin führten folgende Viren zu einer Einschränkung der Mitose: Adenovirus Typ 5 (GODMAN et al. (1960)), Adenovirus Typ 1 - 4 (BOYER et al. (1957)), Adenovirus Typ 3 und 5 (HABERMEHL, pers. Mitt.), Hundehepatitis-Virus (FASTIER (1960)), croup associated Virus (GRESSER et al. (1961)), Myxoviren (LEPINE et al. (1959)).

Die von diesen Autoren beobachtete Hemmung der Zellteilung nach Virusinfektionen besagt lediglich, daß die Mehrzahl der Zellen am Eintritt in die Prophase gehindert wird. Sind die Zellen jedoch einmal in die Mitose eingetreten, so kann diese auch unter den Bedingungen der Virusinfektion zu Ende ablaufen. Aber auch bei Virusinfektionen, welche die Mitose hemmen, können ganz vereinzelt noch zu einem späten Zeitpunkt des Infektions-

ablaufes Mitosen aufgefunden werden. So konnten WHEELOCK et al. (1959) beweisen, daß Zellen, die Newcastle-disease-Virus-Antigen enthalten, noch 5 Stunden nach Infektionsbeginn einen vollständigen Mitosezyklus durchlaufen können; in den Tochterzellen war das Antigen weiterhin nachweisbar.

Bei denjenigen Virusinfektionen, bei denen es zu einem regelrechten und vollständigen Ablauf der Virusinfektion kommt, konnte bisher erst in wenigen Fällen eine Steigerung der Zellteilung beobachtet werden. Latente Infektionen oder Infektionsabläufe, bei denen ein Lysogenie-ähnlicher Zustand besteht, sind von dieser Betrachtung auszuschließen, da hier andere Bedingungen vorliegen.

Eine Steigerung der Zellteilung, welche das Ausmaß der nicht infizierten Kontrollkulturen bis zu 100 % übertrifft, fand sich nach Infektion von Gewebekulturzellen mit verschiedenen Stämmen des Poliomyelitisvirus und mit Rhinovirus. Eine Zwischenstellung nehmen Infektionen mit Polyomavirus ein, bei denen die Zellteilung unverändert abläuft, jedoch nicht das Ausmaß der Kontrollkulturen erreicht (HABERMEHL et al. (1966)). Eine Steigerung der Zellteilung nach Infektion mit Reovirus wurde von DALES (1963) beschrieben. Dieses Ergebnis erfährt eine Einschränkung durch die Tatsache, daß die Steigerung der Zellteilung erst mit beginnendem zytopathischem Effekt in Erscheinung tritt und daß bei der Registrierung pyknotische Zellkerne und Mitosen gleichgesetzt und gemeinsam als Metaphasen gezählt wurden.

Die Steigerung der Zellteilung nach Poliomyelitisinfektion beruht darauf, daß eine größere Anzahl von Zellen aus der Interphase in die Mitose eintreten. Somit handelt es sich um eine echte Zunahme an Zellteilungen. Bei der näheren Untersuchung wurde gefunden, daß diese Mitosesteigerung an das Zustandekommen einer Infektion gebunden

ist und daß es sich hierbei um einen streng virusspezifischen Effekt handelt (HABERMEHL et al. (1966), HABERMEHL (1966)). Für die Erzielung dieses Effektes sind lediglich die ersten Stadien der Virusreproduktion erforderlich. Wird die Entstehung der virusspezifischen Polio-RNS-Polymerase durch Guanidin gehemmt, so bleibt der Effekt der Mitosesteigerung zunächst unverändert bestehen. Daraus folgt, daß die Vorgänge der Virusreproduktion lediglich bis zum Stadium der Polymerisation der Virus-RNS für das Zustandekommen der Mitosesteigerung erforderlich sind (HABERMEHL et al. (1964), HABERMEHL (1966)).

Die bisherigen Untersuchungen der Zellteilung Poliomyelitis-infizierter Kulturen mit oder ohne Guanidineinwirkung erstreckten sich auf den Zeitraum der ersten 5 Stunden nach Infektionsbeginn. Da durch Guanidin der zytopathische Effekt der Poliomyelitisvirusinfektion weitgehend verhindert wird, ergab sich die Frage, ob auch nach diesem Zeitpunkt noch eine Mitosesteigerung beobachtet werden kann. Dies war die Aufgabe der hier durchgeführten Untersuchungen.

Die Hemmung der Virusreproduktion durch Guanidin

RIGHTSEL et al. stellten 1961 erstmals eine hemmende Wirkung des Guanidin bei der Poliomyelitisinfektion fest. Dieser Befund wurde im gleichen Jahr von MELNICK et al. (1961) bestätigt. Nähere Untersuchungen ergaben, daß die Bildung der virusspezifischen Ribonukleinsäure-Polymerase durch diese Substanz verhindert wird (HOLLAND (1962), (1963), (1964), HOLLAND et al. (1964), TAMM et al. (1962), (1963), EGGERS et al. (1963), LODDO et al. (1962), (1963), BALTIMORE et al. (1963)). Diese Untersuchungen wurden in Gewebekulturen durchgeführt, in vivo konnte eine Poliomyelitisinfektion durch Guanidin nicht verhindert werden (BARRERA-ORO et al. (1961)). Der Angriffspunkt des Guanidins ist bisher noch nicht bekannt, eine Zusammenfassung der

Hypothesen findet sich bei LWOFF (1965).

Die Mehrzahl der Autoren nahm an, daß es sich um einen streng virusspezifischen Effekt handelt, d. h. daß lediglich die Virussyntese, nicht aber die Stoffwechselvorgänge der Wirtszelle gehemmt werden. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß in den lediglich mit Guanidin behandelten Gewebekulturen mit steigender Substanzkonzentration eine Hemmung der Zellteilung erfolgt. Auch mit Guanidinkonzentrationen, wie sie üblicherweise zur Hemmung der Poliomyelitisvirusreproduktion verwendet werden (250 µg/ml), konnte bereits eine geringe, jedoch meßbare Verminderung der Zellteilung beobachtet werden. Wie die hier für Guanidin ermittelte Dosen-Wirkungskurve zeigt, findet sich bei Konzentrationen von 250 µg/ml eine Hemmung der Virusreproduktion um 6 log₁₀, während die Zellteilung nach 20stündiger Einwirkung lediglich um 25 % reduziert wird.

Das Guanidin eignet sich für die hier durchgeführten Untersuchungen aus drei Gründen: 1) Neben der geringen Verminderung der Zellteilung finden sich keine erkennbaren morphologischen Schädigungen der Zellen. 2) Die Hemmung der Virusreproduktion ist sehr deutlich. 3) Neben der Hemmung der Neubildung von infektiösem Virus wird durch diese Substanz auch das Auftreten des zytopathischen Effektes verhindert.

Der Ablauf der Mitosen Poliomyelitis-infizierter Zellen unter Guanidin

Die zusammenfassende Beurteilung der Versuchsergebnisse zeigt, daß sich zwei zeitlich aufeinander folgende Stadien unterscheiden lassen.

1) Bis zur 10. Stunde nach Infektionsbeginn finden, in

Übereinstimmung mit Ergebnissen von HABERMEHL et al. (1966), HABERMEHL (1966), noch echte Zellteilungen statt, wobei die Anzahl größer ist als in nicht infizierten Kontrollkulturen.

2) Im Anschluß hieran bestimmen zwei Vorgänge den weiteren Ablauf der Zellteilung: a) Es treten keine weiteren Zellen mehr aus der Interphase in die Prophase ein. b) Die in der Mitose bereits befindlichen Zellen werden auf Grund einer Colchizin-ähnlichen Wirkung im Stadium der Metaphase arretiert.

ad 1) Die bis zur 10. Stunde zu beobachtende Mitosesteigerung der infizierten Kulturen ist in ihrer Ursache noch ungeklärt. Obwohl im Anschluß an eine Poliomyelitisinfektion die Reduplikation der chromosomalen DNS im Laufe einiger Stunden deutlich zurückgeht, reicht die bereits zum Zeitpunkt der Infektion vorhandene DNS aus, um für die nächsten Stunden noch Zellteilungen zu ermöglichen. Eine genügende DNS-Reduplikation ist zwar eine der Voraussetzungen für das Zustandekommen einer Zellteilung, jedoch wahrscheinlich nicht der auslösende Faktor für die Mitosesteigerung während der Poliomyelitisinfektion. Hierfür müssen noch weitere Faktoren von Bedeutung sein, da bei anderen Picornaviren (z. B. ME-Virus) bei gleich starker Hemmung der DNS-Synthese der Wirtzellen die Zellteilung gehemmt wird (HABERMEHL et al.(1967)).

ad 2 a) Die Hemmung der Zellteilung im 2. Stadium, d. h. nach der 10. Stunde p.i., könnte darauf beruhen, daß jetzt nur noch DNS-verarmte Zellen vorhanden sind und somit die Voraussetzung für das Zustandekommen einer Zellteilung nicht mehr gegeben ist. Alle Zellen, die zum Zeitpunkt der Virusinfektion noch genug DNS enthielten, hätten sich innerhalb der ersten 10 Stunden geteilt. Das Vorhandensein einer DNS-Reduplikation ist jedoch nicht die ausschließliche Voraussetzung für das Zustandekommen einer Zellteilung.

Darüberhinaus sind das Ausmaß der RNS- und Protein-Synthese und der Energiestoffwechsel bestimmende Faktoren der Mitose. Wie WHEELLOCK et al. (1961 a, b) und TOBEY et al. (1965) festgestellt haben, besteht ein Zusammenhang zwischen der virusbedingten Hemmung der RNS- und Proteinsynthese und der im Anschluß an die Infektion zu beobachtenden Verminderung der Zellteilung.

ad 2 b) Während der späten Stadien der Virusinfektion wurde weiterhin der Befund eines Colchizin-ähnlichen Effektes erhoben. Dieser ist dadurch gekennzeichnet, daß die Chromosomen im Stadium der Metaphase verbleiben. Die typische Kernteilungsfigur mit Ausbildung der Metaphasenplatte ist gestört. Eine unterschiedliche Anzahl von Chromosomen haben den Verband verlassen, im Extremfall liegen die Chromosomen regellos über die gesamte Zelle verteilt. Für die Dauer der Einwirkungszeit des Guanidins bleibt dieser Befund in den Poliomyelitis-infizierten Zellen unverändert bestehen. Über die Struktur der Chromosomen kann aus den Befunden dieser Arbeit nichts ausgesagt werden, da Chromosomen-Analysen nicht vorgenommen wurden; es scheint jedoch, als ob die Chromosomen etwas verkürzt sind. Desgleichen sind die Struktur der Spindel und die Zentrosomen nicht untersucht worden.

Das Zustandekommen dieses Colchizin-ähnlichen Effektes ist an die gleichzeitige Einwirkung von Guanidin und einer Poliomyelitisvirus-Infektion gebunden. Weder Guanidin allein noch die Virusinfektion allein üben eine solche Wirkung auf die Mitosen aus. Selbst bei hohen Konzentrationen von Guanidin liegt die Zahl der Mitosen mit abgesprengten oder regellos liegenden Chromosomen noch im Normbereich (Abb. 8), lediglich die Gesamtzahl der Mitosen ist etwas vermindert.

Die Ursache für das Zustandekommen des Colchizin-ähnlichen

Effektes und der Mitosehemmung nach länger dauernder Einwirkung von Guanidin auf Poliomyelitis-infizierte Gewebekulturzellen sind vermutlich Frühenzyme, die auf den Mitoseapparat einwirken. Die Bildung einiger Poliomyelitis-induzierter Frühenzyme findet auch noch unter dem hemmenden Einfluß von Guanidin statt. Dies konnte durch zwei Befunde belegt werden: 1) Bereits kurze Zeit nach einer Poliomyelitis-Infektion wird durch die Virus-induzierten Frühenzyme eine Hemmung der Reduplikation von zelleigener DNS bewirkt (HOLLAND et al (1964)). Auch unter der Einwirkung von Guanidin findet diese Hemmung der DNS-Reduplikation statt, wie durch einen Rückgang der Thymidin-Inkorporation nachweisbar ist (HABERMEHL (1966), HABERMEHL et al. (1967)). 2) Einen weiteren Hinweis bietet das Vorhandensein einer gegen Guanidin resistenten Periode im ersten Stadium der Virusreproduktion (DIEFENTHAL (1964), DIEFENTHAL et al. (1965)).

Aus den hier durchgeführten Untersuchungen ist nicht zu ersehen, ob die Frühenzyme allein oder nur in der Kombination mit dem Guanidin zu dem Colchizin-ähnlichen Effekt Anlaß geben. Es wäre denkbar, daß lediglich die langdauernde Einwirkung von Frühenzymen hierfür erforderlich ist, wenn durch Guanidin der zytopathische Effekt verhindert wird. Der Modus dieser Enzymeinwirkung bleibt offen, es bestehen drei hypothetische Möglichkeiten.

- 1) Das Enzym wirkt direkt auf die Chromosomen ein.
 - 2) Das Enzym löst sekundäre Mechanismen aus, die für die Reduplikation des Virus selbst nicht von Bedeutung sind.
 - 3) Die Frühenzyme bewirken eine Schädigung der Lysosomen mit Freisetzung lysosomaler Enzyme, die ihrerseits auf die Chromosomen einwirken (ALLISON et al. (1965)).
- Diese Beispiele beziehen sich lediglich auf die Hemmung der DNS-Reduplikation, ähnliche Einwirkungen von Frühenzymen können aber auch im Hinblick auf die RNS- und

die Proteinsynthese vorhanden sein. Auf diesem Wege könnte eine Störung der Spindelbildung auftreten.

Bei dieser Gelegenheit ist es erforderlich, auf das Vorkommen von Chromosomenaberrationen bei Virusinfektionen einzugehen. Hier handelt es sich meist um Viren, die zur Ausbildung von intranukleären Einschlusskörpern führen, wodurch bereits mechanisch eine besondere Voraussetzung für die Störung der chromosomalen Struktur gegeben ist. Eine Lokalisierung von Viruspartikeln im Mitoseapparat fanden SPENDLOVE et al. (1963) nach Infektion mit Reoviren. Das Antigen fand sich im Spindelbereich und in den Zentriolen. In der Interphase war es in retikulärer Struktur intrazytoplasmatisch gelagert und wanderte später in perinukleäre Bereiche. Die funktionellen Zusammenhänge sind unklar, zumal dieses Virus anfänglich eine Steigerung der Zellteilung bewirkt. Es wurde angenommen, daß das Virusantigen durch die Spindelfasern lediglich räumlich orientiert wird.

Aus der Störung der Chromosomen-Anordnung in der Metaphase darf nicht auf das Vorliegen chromosomaler Aberrationen geschlossen werden. Zu dieser Frage sind gesonderte Untersuchungen erforderlich. Chromosomale Aberrationen sind bei einer Reihe von Virusinfektionen gefunden worden. Ausgeprägte Veränderungen gab es nach Infektionen mit Zoster- und Herpes-simplex-Viren (BENYESH-MELNICK et al. (1964), STICH et al. (1964), HAMPAR et al. (1961), (1963)). Auch bei Infektionen mit Masernvirus waren chromosomale Aberrationen zu beobachten (NICHOLS et al. (1962)). Verklumpungen der in der Metaphase befindlichen Chromosomen fanden sich nach Infektion mit Schweineinfluenzavirus (HACKETT (1961)). Schwere morphologische Veränderungen durch intranucleäre Einschlusskörper unter Vortäuschung des Bildes einer Amitose beobachteten REISSIG et al. (1960) nach Infektion mit Pseudorabiesvirus. Im Verlaufe der

malignen Transformation sind in unterschiedlichem Umfange Chromosomenaberrationen zu beobachten, deren Bedeutung für die Cancerogenese noch offen ist.

Die hier beschriebenen Mitoseveränderungen bei einer durch Guanidin gehemmten Poliomyelitisinfektion stellen einen Sonderfall dar. Diese Ergebnisse sind deshalb nicht unmittelbar vergleichbar mit den oben beschriebenen Mitoseveränderungen bei ungestört ablaufenden Virusinfektionen. Die hier vorgenommene Modifikation des Virusreproduktionszyklus durch einen Inhibitor führt zu neuen Gesichtspunkten der Wechselwirkungen, die zwischen Virusinfektion und Wirtzelle bestehen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

- 1) In Gewebekulturen, die mit Poliomyelitisvirus infiziert und deren Infektionsablauf durch Guanidin gehemmt ist, findet sich bis zur 10. Stunde nach Infektionsbeginn eine gegenüber den Kontrollen deutlich gesteigerte Zellteilung.
- 2) In den späteren Stadien des Infektionsablaufes zeigt sich bei den Guanidin-behandelten, virusinfizierten Zellen eine Störung des Mitoseablaufes. Ein Teil der Mitosen bleibt im Stadium der Metaphase liegen und kann den Mitosezyklus nicht beenden. Zur 14. Stunde p.i. ist diese Mitosearretierung in der Metaphase weitgehend komplett. Außerdem treten keine neuen Zellen mehr in die Mitose ein. Dieser Zustand ist bis zur 22. Stunde nach Infektionsbeginn unverändert zu beobachten.
- 3) Zellen, die bis zur 10. Stunde nach Infektionsbeginn bereits in die Mitose eingetreten sind, werden im Stadium der Metaphase unter dem Bilde eines Colchizin-ähnlichen Effektes arretiert und können den Mitosezyklus nicht beenden. In einem hohen Prozentsatz ist die Metaphasefigur entweder völlig aufgehoben und die Chromosomen regellos über die gesamte Zelle verteilt oder es werden Chromosomen aus dem Verband der Metaphaseplatte abgesprengt.
- 4) Dieser Effekt zeigt sich nur nach längerem Bestehen einer durch Guanidin gehemmten Poliomyelitisvirusinfektion. Nur mit Guanidin behandelte oder nur mit Poliomyelitisvirus infizierte Zellen zeigen diese Mitoseanomalie nicht.
- 5) Als Ursache dieser Zellreaktion wird die Einwirkung der nach Virusinfektion induzierten Frühenzyme diskutiert.

L i t e r a t u r

- Allison, A.C. and G.R. Paton: Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. *Nature* 207, 1170-1173 (1965).
- Baltimore, D., H.J. Eggers, R.M. Franklin and I. Tamm: Poliovirus-induced RNA-polymerase and the effects of virus-specific inhibitors on its production. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 49, 843-849 (1963).
- Barrera-Oro, J.G. and J.L. Melnick: The effect of guanidine:
1) On experimental poliomyelitis induced by oral administration of virus to cynomolgus monkeys.
2) On naturally occurring enteroviruses of cynomolgus monkeys. *Texas Rep. Biol. Med.* 19, 529-539 (1961).
- Benyesh-Melnick, M., H.F. Stich, F. Rapp and T.C. Hsu: Viruses and mammalian chromosomes. III. Effect of herpes zoster virus on human embryonal lung cultures. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 117, 546-549 (1964).
- Boyer, G.S., C. Leuchtenberger and H.S. Ginsberg: Cytological and cytochemical studies of HeLa cells infected with adenoviruses. *J. exptl. Med.* 105, 195-216 (1957).
- Cantell, K., Z. Shurska, K. Paucker and W. Henle: Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. II. Factors affecting interference by UV-irradiated NDV against vesicular stomatitis virus. *Virol.* 17, 312-323 (1962).
- Dales, S.: Association between the spindle apparatus and reovirus. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 50, 268-275 (1963).
- Diefenthal, W. und K.-O. Habermehl: Vorrichtung zur Einstellung eines bestimmten Kohlensäure-Luftgemisches für Monolayer-Gewebekulturen in Petrischalen. *Zbl. Bakt., I. Orig.* 185, 11-13 (1962).
- Diefenthal, W.: Demonstration of an early phase of virus reproduction resistant to inhibitory hydrogen ion concentrations. 14th Ann. Meeting, Canad. Soc. of Microbiol., Fredericton, 1964.
- Diefenthal, W. und K.-O. Habermehl: Untersuchungen über eine frühe Phase der Virusreproduktion. Nachweis einer Resistenz gegenüber dem Einfluß verschiedener Inhibitoren. *Zbl. Bakt., I. Orig.* 198, 331-371 (1965).
- Dulbecco, R. and M. Vogt: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. exptl. Med.* 99, 167-182 (1954).

- Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB (21811).
Proc.Soc.exper.Biol.Med. 89, 362-364 (1955).
- Eagle, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130, 432-437 (1959).
- Eggers, H.J. and I. Tamm: Synergistic effect of 2-(α -hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine on picornavirus reproduction. Nature 199, 513-514 (1963).
- Fastier, L.B.: Mitotic activity of virus infected cells. Virol. 10, 542-547 (1960).
- Godman, G.C., C. Morgan, P.H. Breitenfeld and H.M. Rose: A correlative study by electron and light microscopy of the development of type 5 adenovirus. II. Light microscopy. J.exptl.Med. 112, 383-402 (1960).
- Gresser, I. and J.F. Enders: A note on the presence of inclusion bodies in dividing human kidney cells infected with croup associated virus. Virol. 13, 370-372 (1961).
- Habermehl, K.-O. und W. Diefenthal: The influence of a pox virus infection upon the various stages of the mitotic cycle. VIII. Internat. Congr. Microbiol., Montreal, 1962, a.
- Habermehl, K.-O. und W. Diefenthal: Kinematographische Untersuchungen an Fibroblasten nach Infektion mit Ektromelievirus (Mäusepocken). Arch. Virusforschg. 11, 629-643 (1962), b.
- Habermehl, K.-O. und W. Diefenthal: The influence of virus infections on the mitotic cycle. 14th Ann. Meeting, Canad. Soc. of Microbiol., Fredericton, 1964.
- Habermehl, K.-O. und W. Diefenthal: Der Einfluß von Virusinfektionen auf den Ablauf der Zellteilung. Zbl. Bakt., I. Orig. 199, 273-314 (1966).
- Habermehl, K.-O.: The influence of virus infections on cell division. Abstr. IX. Internat. Congr. Microbiol., Moscow, IX, 490 (1966).
- Habermehl, K.-O. und M. Buchholz: Pers. Mitt., 1967.
- Hackett, A.J.: The cellular changes produced by two variants within the type E 54 of vesicular exanthema of swine virus in tissue culture. Virol. 15, 102-112 (1961).

- Hampar, B. and S.A. Ellison: Chromosomal aberrations induced by an animal virus. *Nature* 192, 145-147 (1961).
- Hampar, B. and S.A. Ellison: Cellular alterations in the MCH line of chinese hamster cells following infection with herpes simplex virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, US 49, 474-480 (1963).
- Holland, J.J.: Altered base ratios in RNA synthesized during enterovirus infection of human cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, US 48, 2044-2051 (1962).
- Holland, J.J.: Depression of host-controlled RNA synthesis in human cells during poliovirus infection. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, US 49, 23-28 (1963).
- Holland, J.J.: Inhibition of host cell macromolecular synthesis by high multiplicities of poliovirus under conditions preventing virus synthesis. *J. Mol. Biol.* 8, 574-581 (1964).
- Holland, J.J. and J.A. Peterson: Nucleic acid and protein synthesis during poliovirus infection of human cells. *J. Mol. Biol.* 8, 556-572 (1964).
- Lepine, P., C. Chany, B. Droz and F. Robbe-Fossat: Cytopathogenic effect of two newly recognized myxovirus strains: Mechanism of syncytial formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 81, 62-72 (1959).
- Loddo, B., W. Ferrari, G. Brotzu and A. Spanedda: In vitro inhibition of infectivity of polio-viruses by guanidine. *Nature* 193, 97-98 (1962).
- Loddo, B., S. Muntoni, A. Spanedda, G. Brotzu and W. Ferrari: Guanidine conditioned infectivity of ribonucleic acid extracted from a strain of guanidine-dependent Polio-1-virus. *Nature* 197, 315 (1963).
- Lwoff, A.: The specific effectors of viral development. *Biochem. J.* 96, 289-301 (1965).
- Melnick, J.L., D. Crowther and J. Barrera-Oro: Rapid development of drug-resistant mutants of poliovirus. *Science* 134, 557 (1961).
- Moon, H.-K.: Der Einfluß einer Pockenvirusinfektion (Ektromelievirus) auf die verschiedenen Mitosestadien von Fibroblasten in der Gewebekultur. *Inaug. Diss.*, Freie Universität Berlin, 1962.
- Nichols, W.W., A. Levan, B. Hall and G. Östergren: Measles - associated chromosome breakage. *Hereditas* 48, 367-370 (1962).

- Paucker, K., Z. Shurska and W. Henle: Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. I. Growth characteristics and interfering activities of vesicular stomatitis virus, NDV and influenza A virus. Virol. 17, 301-311 (1962) a.
- Paucker, K., K. Cantell and W. Henle: Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. Virol. 17, 324-334 (1962) b.
- Paucker, K.: Interference and cell division. 17th Ann. Sympos. on Fundamental Cancer Res., Viruses, Nucleic acids and Cancer, Houston, 1963.
- Reissig, M. and A. S. Kaplan: The induction of amitotic nuclear division by pseudorabies virus multiplying in single rabbit kidney cells. Virol. 11, 1-11 (1960).
- Rightsel, W. A., J. R. Dice, R. J. McAlpine, E. A. Timm, I. W. McLean, jr. G. J. Dixon and F. M. Schabel, Jr.: Antiviral effect of guanidine. Science 134, 558-559 (1961).
- Spendlove, R., E. H. Lennette and A. Ch. John: The role of the mitotic apparatus in the intracellular location of reovirus antigen. J. immunol. 90, 554-560 (1963).
- Stich, H. F., T. C. Hsu and F. Rapp: Viruses and mammalian chromosomes. I. Localization of chromosome aberrations after infection with herpes simplex virus. Virol. 22, 439-445 (1964).
- Stoker, M. G. P. and A. Newton: The effect of herpes virus on HeLa cells dividing parasynchronously. Virol. 7, 438-448 (1959) a.
- Stoker, M. G. P. and A. Newton: Mitotic inhibition in HeLa cells caused by herpes virus. Ann. N. Y. Acad. Sci. 81, 129-132 (1959) b.
- Tamm, I. and H. J. Eggers: Differences in the selective virus inhibitory action of 2-(α -hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine-HCl. Virol. 18, 439-447 (1962).
- Tamm, I. and H. J. Eggers: Specific inhibition of replication of animal viruses. Science 142, 24-33 (1963).
- Tobey, R. A., F. D. Petersen and E. C. Anderson: Mengovirus replication. IV. Inhibition of chinese hamster ovary cell division as a result of infection with mengovirus. Virol. 27, 17-22 (1965).
- Wheelock, E. F. and I. Tamm: Mitosis and division in HeLa cells infected with influenza or Newcastle disease virus. Virol. 8, 532-536 (1959).

- Wheelock, E.F. and I. Tamm: Effect of multiplicity of infection on Newcastle disease virus-HeLa cell interaction. J.exptl.Med. 113, 317-338 (1961) a.
- Wheelock, E.F. and I. Tamm: Biochemical basis for alterations in structure and function of HeLa cells infected with Newcastle disease virus. J.exptl.Med. 114, 617-632 (1961) b.
- Wildy, P., C. Smith, A. Newton and P. Bandy: Quantitative cytological studies on HeLa cells infected with herpes virus. Virol. 15, 486-500 (1961).

Herrn Priv.-Doz.Dr.K.-O.Habermehl bin ich für die Überlassung des Themas, für die vielen Anregungen und für seine ständige Hilfsbereitschaft zu besonderem Dank verpflichtet.

Ausserdem möchte ich den medizinisch-technischen Assistentinnen, Fräulein Erika Siewert und Fräulein Hanna Voss für ihre Unterstützung herzlich danken.

Lebenslauf

Am 6. Mai 1940 wurde ich in Berlin als Tochter des Architekten Otto Kochan und seiner Ehefrau Charlotte geboren.

Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Grundschule, anschliessend die Franziskus - Oberschule in Berlin - Schöneberg. Am 26. Februar 1959 bestand ich das Abitur.

Ich hatte mich zunächst für den Beruf der Fürsorgerin entschieden und besuchte vom 1. April bis 31. Dezember 1959 das Seminar für soziale Arbeit des Pestalozzi - Fröbel - Hauses in Berlin.

Seit dem Sommersemester 1960 studiere ich an der Freien Universität Berlin Medizin. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich am 5. Mai 1961, die ärztliche Vorprüfung am 29. März 1963 mit dem Gesamturteil "gut". Das medizinische Staatsexamen habe ich am 28. Februar 1967 mit dem Gesamturteil "gut" bestanden.

In der Zeit von 1964 bis 1966 war ich unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. K.-O. Habermehl mit der Durchführung meiner Doktorarbeit beschäftigt.

